

**Regulation der Internalisierung, Desensibilisierung und
Down-Regulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren
durch Rezeptorkinasen, Intersectin, Endophilin und Ubiquitin**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereiches
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Björn Peter Kaiser

aus Dortmund

Oktober 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K.H. Jakobs

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2004

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	1
1.2 Heterotrimere G-Proteine	2
1.3 Phosphorylierung und Desensibilisierung von GPCRen	4
1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen	5
1.3.2 Caseinkinase 1 α	7
1.4 Internalisierung von mAChRen	8
1.4.1 Regulation der mAChR-Internalisierung	9
1.4.2 Rolle von Dynamin bei der mAChR-Internalisierung	10
1.5 Intersectin	14
1.6 Endophilin	14
1.7 Ubiquitynylierung von Proteinen	16
1.8 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Radioaktive Chemikalien	22
2.1.3 Antikörper und Enzyme	23
2.1.4 Plasmide	23
2.1.5 Sonstige Materialien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen	25
2.2.2 <i>E. coli</i> -Kultivierung	26
2.2.3 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien	26
2.2.4 DNA-Transfektion von HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen	27
2.2.5 DNA-Transfektion mittels FuGENE 6-Reagenz	28
2.2.6 Isolierung einzelner G418-resistenter HEK293-Zellklone	28
2.2.7 DNA-Techniken	29
2.2.7.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.2.7.2 Gerichtete Mutagenese	29
2.2.8 Proteinbiochemische Methoden	30

2.2.8.1	Proteinbestimmung nach Bradford	30
2.2.8.2	BCA-Proteinbestimmung	30
2.2.8.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.8.4	Coomassie-Blau-Färbung	32
2.2.8.5	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)	32
2.2.8.6	Bestimmung der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2	33
2.2.8.7	Translokation intrazellulärer Proteine	34
2.2.8.8	Phosphorylierung von mAChRen	35
2.2.8.9	Immunocytochemie	35
2.2.9	Ligandenbindungsuntersuchungen	36
2.2.9.1	[³ H]QNB-Bindungsassay	36
2.2.9.2	[³ H]NMS-Bindungsassay	37
2.2.9.3	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsassay	38
2.2.10	Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität	39
2.2.11	Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität	40
2.2.12	Bestimmung des zellulären Gehaltes an PI(4,5)P ₂	41
2.2.13	Bestimmung der intrazellulären freien Ca ²⁺ -Konzentration	42
2.2.14	Datenauswertung	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Rolle der GRK2 und CK1α bei der Internalisierung und Desensibilisierung von mAChRen	43
3.1.1	Expression von GRK2, CK1α und ihren dominant-negativen Mutanten in HEK293 tsA201-Zellen	43
3.1.2	Einfluß der GRK2 und CK1α auf die Desensibilisierung und Internalisierung von M ₂ und M ₄ mAChRen	44
3.1.3	Einfluß der GRK2 und CK1α auf die Internalisierung und Desensibilisierung von M ₁ und M ₃ mAChRen	48
3.2	Rolle von Intersectin bei der Internalisierung von mAChRen	53
3.2.1	Einfluß von Intersectin auf die Internalisierung des M ₂ mAChRs	54
3.2.2	Einfluß von Intersectin auf die Internalisierung des M ₁ mAChRs	60
3.3	Rolle von Endophilin bei der Internalisierung von mAChRen	61
3.4	Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Down-Regulation des M ₂ mAChRs	67
3.4.1	Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Desensibilisierung des M ₂ mAChRs	67
3.4.2	Rolle von Ubiquitin bei der Down-Regulation des M ₂ mAChRs	70

4	Diskussion	73
4.1	Rolle der GRK2 und CK1 α bei der Desensibilisierung und Internalisierung von mAChRen	73
4.2	Rolle von Intersectin bei der Internalisierung der M ₁ und M ₂ mAChRen	76
4.3	Rolle von Endophilin bei der Internalisierung von mAChRen	78
4.4	Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Down-Regulation des M ₂ mAChRs	80
4.5	Bedeutung der verschiedenen untersuchten Proteine für die Internalisierung von mAChR-Subtypen	81
5	Zusammenfassung	84
6	Referenzen	86
7	Anhang	95

Verwendete Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, Dinatriumsalz
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	Komplementäre DNA (copy DNA)
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bequerel)
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	Ehtylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP γ S	Guanosin-5' [γ -thio]-triphosphat
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen (Human embryonic kidney cells)
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IP	Inositolphosphat
mAChR	Muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
MG	Molekulargewicht
(m/v)	Masse pro Volumen
NMS	N-Methylscopolamin
O.D.	Optische Dichte

PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>Pfu</i> Turbo-Polymerase	<i>Pyrococcus furiosus</i> Turbo-Polymerase
PH	"pleckstrin homology"
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdEtOH	Phosphatidylethanol
QNB	Quinuclidinylbenzilat
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat ("Sodium dodecylsulfat")
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SH	"src homology"
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumen pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Der Neurotransmitter Acetylcholin wirkt über zwei prinzipiell unterschiedliche Typen von Membranrezeptoren, die nikotinischen Rezeptoren, die Liganden-gesteuerte Ionenkanäle darstellen, und die muskarinischen Rezeptoren. Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRen) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRen), die eine der größten und vielseitigsten Familie von Membranrezeptoren darstellen. Der generelle Aufbau dieser Rezeptoren ist charakterisiert durch sieben hydrophobe transmembranäre Helices, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Bindet ein Agonist an einen GPCR, so vollzieht dieser eine Konformationsänderung, was zur Aktivierung des heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteins (G-Proteins) und seiner Dissoziation vom Rezeptor führt. Die aktivierten G-Proteine binden ihrerseits an Effektoren und modulieren deren Aktivität (Abb. 1.1).

In Säugetieren konnten fünf mAChR-Subtypen (M_1 - M_5) identifiziert werden, wobei jeder mAChR-Subtyp das Produkt von unterschiedlichen Genen ist (Bonner *et al.*, 1987, 1988; Peralta *et al.*, 1987; Caulfield, 1993). Die mAChR-Subtypen sind im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in verschiedenen peripheren Organen lokalisiert, wo sie insbesondere die Wirkungen des Parasympathikus vermitteln (Levey *et al.*, 1991, 1993; Caulfield, 1993). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der mAChR-Subtypen ist ihre Kopplung an unterschiedliche G-Proteine, die schließlich die zelluläre Antwort auslösen. Die M_1 , M_3 und M_5 mAChR-Subtypen koppeln bevorzugt an die Pertussis-Toxin-insensitiven G-Proteine der G_q - und G_{12} -Familien und bewirken dadurch u.a. eine Aktivierung der Phospholipasen C (PLC) und D (PLD). Dagegen koppeln die M_2 und M_4 mAChR-Subtypen bevorzugt an die Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteine der G_i -Familie, was u.a. zur Hemmung der Adenylylcyclase führt (Caulfield, 1993; Rumenapp *et al.*, 2001).

In funktionellen Studien an genetisch veränderten Mäusen zu den jeweiligen mAChR-Subtypen konnten verschiedene bisher bekannte und auch unbekannte Funktionen der mAChRen verifiziert bzw. identifiziert werden. Im Zentralnervensystem aktiviert der M_1 mAChR z.B. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen; Hamilton *et al.*, 1997; Hamilton und Nathanson, 2001), ein Prozeß, der im Zusammenhang mit Gedächtnis- und Lernvorgängen steht. In Mäusen, bei denen die M_1 mAChR-Expression ausgeschaltet war, fand sich eine signifikant erhöhte Dopamin-Transmission im Striatum und eine zunehmende

lokomotorische Aktivität der Tiere (Gerber *et al.*, 2001; Miyakawa *et al.*, 2001). Der auch im Gehirn exprimierte M_2 mAChR ist an der Antinozizeption (Hemmung des Schmerzempfindens) beteiligt. In M_2 mAChR-defizienten Mäusen kam es zur Aufhebung des Agonist-induzierten Tremors und zur Abschwächung der Agonist-induzierten Hypothermie (Gomez *et al.*, 1999a). In der Peripherie ist der M_2 mAChR maßgeblich im Herzen zu finden, wo er die Wirkungen des Parasympathikus auf Herzrhythmus und Kontraktilität vermittelt. Auch findet sich der M_2 mAChR im geringerem Maße im Magen, der Blase und Lunge, wo er teilweise an der Kontraktion dieser Organe beteiligt ist (Stengel *et al.*, 2000). Der M_3 mAChR hat eine Schlüsselfunktion bei der Sekretion von exokrinen Drüsen, der Verengung der Pupillen und bei der Blasenkontraktion (Matsui *et al.*, 2000). Auch bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Appetit ist der M_3 mAChR beteiligt. Untersuchungen an M_3 mAChR-defizienten Mäusen hatten ergeben, daß sowohl das Körpergewicht als auch die Fetteinlagerung bei den Tieren signifikant reduziert war (Yamada *et al.*, 2001). Wie der M_1 mAChR ist auch der M_4 mAChR an der zentralen Dopamin-Antwort beteiligt. So führt ein Verlust des M_4 mAChRs in den Mäusen, ähnlich wie beim M_1 mAChR, zur Zunahme der Lokomotion, wobei eine zeitgleiche Stimulation des Dopamin D_1 -Rezeptors die Lokomotion zusätzlich verstärkt (Gomez *et al.*, 1999b). Der M_5 mAChR wird im Hippocampus und in der Substantia nigra exprimiert (Eglen und Nahorski, 2000). Ausschaltung dieses Rezeptors zeigte, daß er bei der striatalen Dopamin-Freisetzung und bei Morphin-Gewöhnungs- und -Entwöhnungsprozessen modulierend eingreift (Basile *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

1.2 Heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren G-Proteine sind intrazellulär an der Membran lokalisiert. Sie bestehen aus drei Untereinheiten, α (MG 39-52 kDa), β (MG 33-36 kDa) und γ (MG 5-8 kDa), wobei die β - und γ -Untereinheiten immer als $\beta\gamma$ -Heterodimere vorliegen. Die $G\alpha$ -Untereinheiten enthalten die Bindungsstelle für die Guaninnukleotide GDP und GTP sowie eine intrinsische GTPase-Aktivität. Wird ein GPCR aktiviert, so führt dies zur Freisetzung von GDP von der $G\alpha$ -Untereinheit des mit dem GPCR interagierenden G-Proteins, an die nun GTP binden kann. Infolge der GTP-Bindung dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit sowohl vom Rezeptor als auch vom $G\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl $G\alpha$ -Untereinheit als auch $G\beta\gamma$ -Dimer aktivieren spezifische Effektoren (Hamm, 1998, 2001). Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP durch die $G\alpha$ -Untereinheit. Dieser Prozess kann durch spezifische Effektoren (z.B. die PLC- β) und besonders durch die sog. RGS-Proteine (s. unten) beschleunigt werden. Die GDP-gebundenen $G\alpha$ -Untereinheiten dissoziieren vom Effektor

und reassoziieren mit freien G $\beta\gamma$ -Dimeren, so daß sie als inaktive Heterotrimere wieder durch Rezeptoren aktiviert werden können (Bünemann und Hosey, 1999).

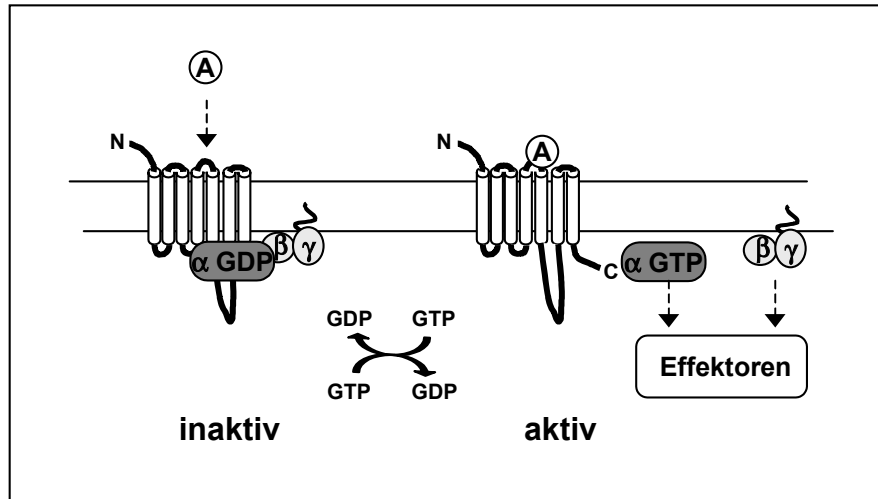


Abb. 1.1: Aktivierung und Inaktivierung von heterotrimeren G-Proteinen.

(A, Agonist; für weitere Details siehe Text)

Die G α -Untereinheiten determinieren im wesentlichen die Spezifität der G-Proteine, einerseits hinsichtlich der Rezeptoren und andererseits für die Effektoren. Anhand der Aminosäuresequenzen der G α -Untereinheiten lassen sich die heterotrimeren G-Proteine in vier Gruppen unterteilen: G $_s$, G $_i$, G $_q$ und G $_{12}$ (Simon *et al.*, 1991). Die Pertussis-Toxin-insensitiven G-Proteine der G $_s$ -Familie stimulieren die Adenylylcyclase. In Gegensatz dazu führt die Aktivierung der Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteine der G $_i$ -Familie zur Hemmung der Adenylylcyclase. Darüber hinaus können aktivierte G $_i$ -Proteine auch bestimmte spannungsabhängige Ca $^{2+}$ -Kanäle hemmen sowie zur Aktivierung von bestimmten K $^{+}$ -Kanälen und PLC- β -Subtypen führen. Diese Wirkungen von G $_i$ -Proteinen erfolgt im wesentlichen über freie G $\beta\gamma$ -Dimere, die noch weitere Effektoren, z.B. Isoformen der Phosphatidylinositol-3-Kinase aktivieren können. Die G-Proteine der G $_q$ -Familie sind potente Aktivatoren der PLC- β -Enzyme. Die direkten Effektoren der G $_{12}$ -Proteine sind bisher nicht identifiziert, aber es ist bekannt, daß sie verschiedene monomere GTPasen, bes. Rho-GTPasen aktivieren sowie an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind (Neer, 1995; Hall, 1998; Rhee, 2001). Pertussis-Toxin modifiziert spezifisch die α -Untereinheiten der G $_i$ -Familie durch ADP-Ribosylierung, wodurch die Aktivierung dieser G-Proteine durch Rezeptoren blockiert wird (Hamm und Gilchrist, 1996).

1.3 Phosphorylierung und Desensibilisierung von GPCRen

Als Desensibilisierung bezeichnet man den Vorgang, der zur Abschwächung des vom Rezeptor induzierten Signals führt. Für die Zelle ist dies ein essentieller Vorgang, um auf wiederholte oder langandauernde Stimuli das Gleichgewicht zu erhalten. Zwei generelle Mechanismen der Desensibilisierung sind bekannt: die homologe Form der Desensibilisierung, wobei der aktivierte Rezeptor zu seiner eigenen Abschaltung führt, und die heterologe Form, bei der die Desensibilisierung durch Aktivierung eines anderen Rezeptors ausgelöst wird (Bünemann und Hosey, 1999). Obwohl viele Mechanismen, die zur Desensibilisierung von GPCRen führen, bekannt sind, sind längst noch nicht alle im Einzelnen aufgeklärt.

Die homologe Desensibilisierung der GPCRen, auch der mAChRen, erfolgt während der Bindung des Agonisten am Rezeptor (Krupnick und Benovic, 1998; Bünemann und Hosey 1999). Die Zeitspanne und das Ausmaß der Desensibilisierung variiert vom mAChR-Subtyp und dem zellulären Hintergrund (van Koppen und Kaiser, 2003). Der erste Schritt bei der Agonist-induzierten Desensibilisierung von mAChRen ist die Rezeptor-Phosphorylierung, die nach kurzfristiger Rezeptor-Stimulation (Sekunden, Minuten) durch die G-Proteingekoppelten Rezeptorkinasen (GRKn) und auch die Caseinkinase 1 α (CK1 α) katalysiert wird (Tobin *et al.*, 1997; van Koppen und Kaiser, 2003). Die durch *second messenger* aktivierten Proteinkinasen, wie die durch Diacylglycerol aktivierten Isoformen der Proteinkinase C (PKC) und die cAMP-abhängigen Proteinkinasen A (PKA), phosphorylieren GPCRen auch in Abwesenheit eines Agonisten. Auch dies führt zur Rezeptor-Desensibilisierung (heterologe Form) (Ferguson, 2001; van Koppen und Kaiser, 2003). Das Ausmaß der durch PKA bzw. PKC vermittelten mAChR-Desensibilisierung ist jedoch meist geringer als die GRK-induzierte Desensibilisierung (Ferguson, 2001). Alle diese Kinasen phosphorylieren Rezeptoren, wobei Serin- und Threoninreste in der dritten zytoplasmatischen Schleife bevorzugt werden und am C-Terminus. Jede dieser Kinasen phosphoryliert anscheinend spezifische Aminosäurepositionen (Krupnick und Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998; Ferguson, 2001).

Die Phosphorylierung allein ist meistens nicht ausreichend, um GPCRen zu desensibilisieren, aber sie ist ein wesentlicher Trigger dieser Reaktion. Hierfür sind die Arrestine verantwortlich, zytosolische Proteine, deren Bindungsaffinität zu den GPCRen durch deren Phosphorylierung stark gesteigert wird. In Folge der Arrestin-Bindung werden die GPCRen von den heterotrimeren G-Proteinen entkoppelt, was zur Unterbrechung der Signalweiterleitung führt (Ferguson, 2001). Bisher konnten vier verschiedene Arrestine nachgewiesen werden (Arrestin 1-4; Craft und Whitmore, 1995). Aufgrund ihrer Lokalisation werden die

Arrestine in zwei Gruppen eingeteilt, visuelle und nicht-visuelle Arrestine. Die nicht-visuellen Arrestine, Arrestin-2 (β -Arrestin-1) und Arrestin-3 (β -Arrestin-2) werden ubiquitär exprimiert und sind neben der GPCR-Desensibilisierung auch offensichtlich in weitere zelluläre Prozesse eingeschaltet, wie Rezeptor-Endozytose (s. unten) und Aktivierung von MAP-Kinasen (Kim und Benovic, 2002).

Wie oben erwähnt, kann die Hydrolyse von GTP zu GDP, d.h. die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheiten und damit die Inaktivierung der G-Proteine, durch die sog. RGS-Proteine (*Regulators of G-Protein Signaling*) stark beschleunigt werden. Die RGS-Proteinfamilie umfaßt mehr als 30 Mitglieder, die durch konservierte RGS-Domänen charakterisiert sind (Siderovski *et al.*, 1996; Hollinger und Helper, 2002). Ob diese Proteine, die aufgrund ihrer GTPase-aktivierenden Wirkung die Dauer des Aktivitätszustandes von G-Proteinen bestimmen und auch an der Desensibilisierung von GPCRen beteiligt sind, d.h. z.B. durch GPCRen in ihrer Wirkung stimuliert werden, ist bisher nicht bekannt.

1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKn) sind Serin/Threonin-Kinasen, die spezifisch Agonist-aktivierte GPCRen phosphorylieren. Bisher kennt man sieben GRKn, GRK1-7. Die Expression von GRK1 und GRK7 erfolgt ausschließlich in der Retina, GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 werden ubiquitär exprimiert, während GRK4 prädominant im Hoden und im Gehirn exprimiert wird. Von den nicht-retinalen GRKn sind GRK2 und GRK3 am besten charakterisiert (Pitcher *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1998; Iacovelli *et al.*, 1999; Ferguson, 2001).

In nicht-stimulierten Zellen sind GRK2 und GRK3 im Zytosol lokalisiert, von wo sie nach GPCR-Aktivierung an die Plasmamembran translozieren. Diese Translokation setzt die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins und seine Dissoziation in $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten voraus, da GRK2/3 an freie $G\beta\gamma$ -Dimere binden, um GPCRen wie die mAChRen zu phosphorylieren. Diese Interaktion von GRK2/3 mit den freien $G\beta\gamma$ -Dimeren wird durch die C-terminale, 125 Aminosäuren umfassende PH-Domäne (*pleckstrin homology*) der GRK2/3 realisiert (Krupnick und Benovic, 1998). Wird in Zellen der isolierte C-Terminus von GRK2 (β ARK-CT) exprimiert, so bindet dieses Peptid an die freien $G\beta\gamma$ -Dimere, wodurch sowohl die Translokation der GRK2 an die Membran als auch die durch die GRK2 vermittelte Desensibilisierung *in vitro* und *in vivo* inhibiert wird (Koch *et al.*, 1993, 1995; Dicker *et al.*, 1999). Funktionelle Untersuchungen zur GRK2 konnten zeigen, daß die GRK2 den M_1 , M_2

und M₃ mAChR in einer Agonist- und G β γ -abhängigen Weise phosphoryliert (Haga *et al.*, 1994, 1996; DebBurman *et al.*, 1995; Pals-Rylaarsdam *et al.*, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, daß durch Expression einer dominant-negativen Mutante von GRK2 (GRK2 K220W) die Agonist-induzierte Phosphorylierung des M₂ mAChRs und die Desensibilisierung der Hemmung der Adenylylcyclase über diesen Rezeptor unterdrückt werden (Pals-Rylaarsdam und Hosey, 1997). Darüber hinaus kann die Translokation von GRK2/3 an die Membran auch durch die Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) erfolgen (Pitcher *et al.*, 1995). Generell haben die bisherigen Studien gezeigt, daß die Phosphorylierung mit einer Desensibilisierung von mAChRen einhergeht.

Kürzlich wurde gezeigt, daß die MAP-Kinasen ERK1/2 die Kinase-Aktivität von GRK2 durch Phosphorylierung von Serin an der Aminosäureposition 670 am C-Terminus von GRK2 herabsetzen können (Pitcher *et al.*, 1999; Elorza *et al.*, 2000). Andererseits kann die Aktivität von GRK2 auch durch eine PKC-vermittelte Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase c-Src gesteigert werden (van Koppen und Kaiser, 2003). Da mAChRen die Aktivitäten von ERK1/2, PKC und c-Src stimulieren können, ist es also denkbar, daß die Desensibilisierung von mAChRen über eine Feedback-Stimulation und/oder -Inhibition der GRK2-Aktivität reguliert wird (van Koppen und Kaiser, 2003).

Die GRKn GRK4, GRK5 und GRK6 liegen unabhängig von einer GPCR-Aktivierung an der Membran lokalisiert vor. Die Membranverankerung von GRK4 und GRK6 erfolgt über eine Palmitoylierung dieser Kinasen am C-Terminus. Diese reversible post-translationale Modifikation ist auch entscheidend für die funktionelle Aktivität von GRK4 und GRK6 (Stoffel *et al.*, 1994, 1998; Premont *et al.*, 1996; Ferguson, 2001). Im Gegensatz zu GRK4 und GRK6 ist die GRK5 durch Wechselwirkungen zwischen 46 C-terminal lokalisierten, basischen Aminosäuren mit Membran-Phospholipiden an der Membran lokalisiert. Diese Interaktion mit Membran-Phospholipiden ist für die Kinaseaktivität der GRK5 entscheidend (Kunapuli *et al.*, 1994; Premont *et al.*, 1994).

Ob die mAChRen Substrate für GRK5 und GRK6 darstellen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Zwar konnte eine Beteiligung von GRK5 und GRK6 bei der *in vitro* Phosphorylierung des M₃ mAChRs gezeigt werden (DebBurman *et al.*, 1995). Andererseits stellten M₁ und M₂ mAChRen sehr schwache *in vitro* Substrate für GRK5 und GRK6 dar. Eine ausbleibende *in vitro* Kinaseaktivität spiegelt aber nicht notwendigerweise die *in vivo* Situation wider (van Koppen und Kaiser, 2003).

1.3.2 Caseinkinase 1 α

Die Familie der Caseinkinasen, benannt nach ihrem primär *in vitro* identifizierten Substrat Casein, besteht aus zwei Subfamilien, Caseinkinase 1 (CK1) und CK2 (Tobin, 2002). Die CK1-Familie besteht aus sieben Vertretern (CK1 α , β , γ_{1-3} , δ und ϵ). Diese Kinasen, die anscheinend an diversen Signalwegen und an der Kontrolle von verschiedenen physiologischen Prozessen, wie DNA-Reparatur, Tagesrhythmus und Zelldifferenzierung beteiligt sind, werden ubiquitär exprimiert und weisen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung auf. So sind sie an der Plasmamembran, im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert. Eine Mutation der CK1 α in Aminosäureposition 46 von Lysin zu Arginin (ATP-Bindungsstelle) führt zu einer katalytisch inaktiven Kinase (Budd *et al.*, 2000).

In Studien zur Phosphorylierung des M₃ mAChRs in CHO-Zellen wurde gezeigt, daß der Rezeptor auch phosphoryliert wird, wenn sowohl die GRK2 als auch die PKC durch Hemmstoffe inaktiviert wurde (Tobin *et al.*, 1993). In weiterführenden Arbeiten wurde dann die CK1 α identifiziert, welche den M₃ und M₁ mAChR in einer Agonist-abhängigen Weise an Serin- und Threonin-Resten in der dritten zytoplasmatischen Schleife phosphoryliert (Tobin *et al.*, 1996, 1997; Waugh *et al.*, 1999). Die durch die CK1 α phosphorylierten Serin- und Threonin-Reste liegen in einem Bereich (370Lys - 425Ser) des M₃ mAChRs, der C-terminal der putativen G $\beta\gamma$ -Bindungsstelle und den durch die GRK2 vermittelten Phosphorylierung lokalisiert ist (Budd *et al.*, 2000, 2001; Wu *et al.*, 2000). Durch die Phosphorylierung des M₃ mAChRs durch die CK1 α wurde weder die Kopplung des Rezeptor an die PLC noch die durch den Rezeptor induzierte Calcium-Freisetzung in CHO-Zellen signifikant gehemmt.

In weiterführenden Studien konnte dann gezeigt werden, daß die Phosphorylierung des M₃ mAChRs durch die CK1 α an der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 beteiligt ist (Budd *et al.*, 2001). Dieser ERK1/2-Signalweg konnte jedoch nicht vollständig durch Hemmung der M₃ mAChR-Phosphorylierung blockiert werden. Es ist bekannt, daß der M₃ mAChR über G_q-Proteine an die PLC koppelt und darüber zur PKC-Aktivierung und zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Wylie *et al.*, 1999). Aus diesen Daten wurde ein Modell zur M₃ mAChR-vermittelten Aktivierung des ERK1/2-Signalweges in CHO-Zellen entwickelt, in dem die CK1 α -abhängige Phosphorylierung des M₃ mAChRs (Mechanismus 2) und die PKC (Mechanismus 1) synergistisch wirken, um die vollständige Aktivierung von ERK1/2 zu bewirken (Abb. 1.2; Tobin, 2002). Dieses Modell impliziert, daß

durch die Phosphorylierung des M₃ mAChRs durch CK1 α bzw. GRK in den Zellen verschiedene funktionelle Zellantworten ausgelöst werden (Tobin, 2002).

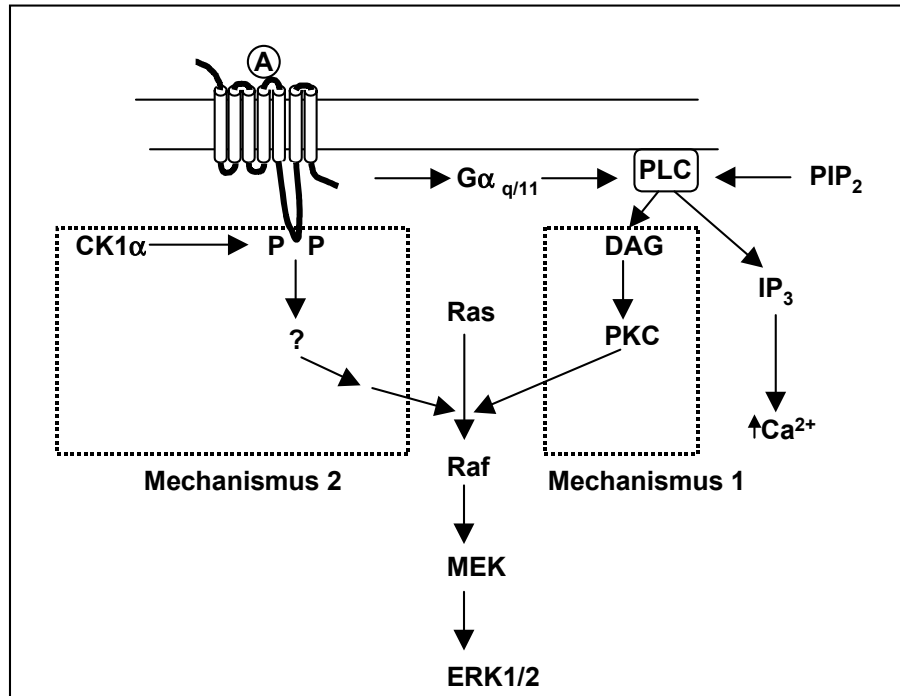


Abb. 1.2: M₃ mAChR-abhängige Aktivierung des ERK1/2 Signalweges in CHO-Zellen. (MEK, MAP-Kinase Kinase; modifiziert nach Tobin, 2002)

1.4 Internalisierung von mAChRen

Voraussetzung für die Internalisierung oder Endozytose von mAChRen und vielen andere GPCRen ist die Phosphorylierung der Rezeptoren (Nathanson, 1987; von Zastrow und Kobilka, 1992; van Koppen und Kaiser, 2003). Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß durch Entfernung der putativen Phosphorylierungsstellen die Internalisierung des M₁, M₂ und M₃ mAChRs merklich abnimmt (Lameh *et al.*, 1992; Moro *et al.*, 1993; Pals-Rylaarsdam und Hosey, 1997). Wie viele andere GPCRen kehren internalisierte M₁, M₃ und M₄ mAChRen wieder an die Zellmembran zurück, ohne daß hierfür *de novo*-Proteinsynthese erforderlich ist, während internalisierte M₂ mAChRen in der Zelle abgebaut werden (van Koppen, 2001). Der Rezeptor-Internalisierung werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (Ceresa und Schmid, 2000). Einerseits wird angenommen, daß die Internalisierung zur Aktivierung von zytosolischen Signalproteinen führt. So wurden Hinweise dafür erbracht, daß die Internalisie-

rung von diversen GPCRen, inkl. des M₁ mAChRs, und auch von Tyrosinkinase-Rezeptoren für die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen erforderlich ist (Vögler *et al.*, 1999; Ceresa und Schmid, 2000; Pierce *et al.*, 2000). Andererseits gibt es auch gute Hinweise dafür, daß die Internalisierung zur Resensibilisierung der phosphorylierten Rezeptoren führt, wobei der Rezeptor nach Dephosphorylierung anschließend zur Plasmamembran zurückkehrt (Yu *et al.*, 1993; Pippig *et al.*, 1995; Ferguson, 2001).

Hält die Stimulation von mAChRen und anderen Rezeptoren sehr lange (Stunden) an, kommt es häufig zur sog. Down-Regulation, d.h. zu einer Abnahme der Gesamtzahl der Rezeptoren. Ursachen einer solchen Abnahme können neben einem vermehrten Abbau auch verminderte Translation und Transkription der mAChRen sein. Generell bedeutet das, daß für die Normalisierung der Rezeptorzahl nach einer Down-Regulation die *de novo*-Proteinsynthese erforderlich ist (Nathanson, 1987; van Koppen und Kaiser, 2003).

1.4.1 Regulation der mAChR-Internalisierung

Wie für viele andere GPCRen gezeigt, internalisieren auch die M₁, M₃ und M₄ mAChRen nach Bindung von Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor über sog. *clathrin-coated vesicles* (CCV; Vögler *et al.*, 1999; van Koppen, 2001). So konnte die Internalisierung dieser mAChR-Subtypen sowohl durch Expression einer dominant-negativen Mutante von β -Arrestin-1 als auch durch Expression einer dominant-negativen Mutante von Clathrin signifikant gehemmt werden (Vögler *et al.*, 1999; Claing *et al.*, 2000). Die derzeitige Vorstellung geht davon aus, daß β -Arrestin einerseits mit hoher Affinität an Clathrin (Goodman *et al.*, 1996) und andererseits an die β 2-Untereinheit (β 2-Adaptin) von AP-2 (*clathrin adapter protein 2*) bindet. Über dieses Zusammenspiel wird Clathrin selektiv am entstehenden Vesikel rekrutiert und der Rezeptor immobilisiert. In *in vitro* Untersuchungen zur Bindung zwischen β 2-Adaptin zu β -Arrestin konnten zwei Glutamat-Reste (849 und 902) an β 2-Adaptin und zwei Arginin-Reste (394 und 396) an β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2 als essentielle Aminosäuren für die Interaktionen dieser Proteine identifiziert werden (Laporte *et al.*, 2000; 2002). Die Bedeutung der β -Arrestin/AP-2/Clathrin-Komplexbildung für die Internalisierung von GPCRen wurde durch die Expression von entsprechenden dominant-negativen Mutanten verifiziert (Laporte *et al.*, 2002). Insgesamt erfordert die Clathrin-vermittelte Endozytose von Membranrezeptoren also eine räumlich und zeitlich gut koordinierte Regulation von multiplen Protein-Protein-Interaktionen.

Im Gegensatz zu den M₁, M₃ und M₄ mAChRs internalisiert der M₂ mAChR in einer Arrestin- und Clathrin-unabhängigen Weise (Vögler *et al.*, 1998; Claing *et al.*, 2000; Roseberry und Hosey, 2001). Dies zeigt, daß die Phosphorylierung des M₂ mAChRs nicht unmittelbar mit der Bindung von Arrestin verknüpft sein muß. So konnten Wu und Mitarbeiter (1997) zeigen, daß eine isolierte Peptidkette aus der dritten zytoplasmatischen Schleife (His208 - Arg387) des M₂ mAChRs, neben den GRK2-Phosphorylierungsstellen zwar eine putative Arrestin-Bindungsstelle aufweist, aber gereinigtes Arrestin nicht bindet. Es ist daher anzunehmen, daß bisher unbekannte zytosolische Proteine an den phosphorylierten M₂ mAChR binden und die nicht Clathrin-abhängige Internalisierung des Rezeptors bewirken.

1.4.2 Rolle von Dynamin bei der mAChR-Internalisierung

Dynamine sind zytosolische GTPasen mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Drei Isoformen (Dynamin-1/2/3) mit diversen Splice-Varianten von Dynamin sind bekannt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die Dynamine sind Multidomänen-Proteine, charakterisiert durch die N-terminale GTPase-Domäne, eine mittlere Domäne und eine GTPase-Effektor-Domäne (Hinshaw, 2000). Zusätzlich verfügt Dynamin über eine PH-Domäne zur Bindung von PIP₂ und Gβγ-Dimeren sowie eine C-terminale Prolin/Arginin-reiche (PRD) Domäne, worüber Interaktionen zu SH3-Domänen (*c-Src homology 3*) mit anderen Proteinen resultieren (Salim *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Hinshaw, 2000). Funktionell sind die Dynamine durch ihre relativ niedrige Affinität zu GTP im Vergleich zu anderen GTPasen und durch das spontane *self assembly* zu spiralförmigen Ringstrukturen charakterisiert, wodurch die GTPase-Aktivität gesteigert wird. Ähnlich wie andere GTPasen wechseln auch Dynamine zwischen zwei Konformationszuständen, einer GDP- und einer GTP-gebundenen Konformation. Die Aktivierung von Dynamin, d.h. der Austausch von GDP gegen GTP erfolgt unabhängig von regulatorischen Proteinen (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren), aufgrund der sehr schnellen spontanen Dissoziationsrate von GDP (93 sec⁻¹; Binns *et al.*, 2000). Aufgrund des Überschusses von GTP über GDP in den Zellen ist demnach zu erwarten, daß > 95% des Dynamins in der GTP-gebundenen Konformation vorliegt. In der GTP-gebundenen Form interagieren Dynamine mit Effektor-Proteinen, die durch die Hydrolyse von GTP wieder terminiert werden.

Zur Abschnürung der invaginierten CCV durch Dynamin werden zwei Modelle diskutiert (Song und Schmid, 2003). Nach dem ersten Modell wirkt Dynamin als mechanochemische GTPase, die in der GTP-gebundenen Konformation spiralförmige bzw. ringähnliche Strukturen um den Hals des Vesikels ausbildet. Durch die anschließende Hydrolyse von GTP

und die dadurch freigesetzte Energie kommt es durch das Herunterdrücken des Dynaminringes zur Abschnürung des Vesikels (Abb. 1.3; Song und Schmid, 2003). Nach dem zweiten Modell wirkt Dynamin als regulatorische GTPase, die in der GTP-gebundenen Form am entstehenden Vesikel lokalisiert ist. Entscheidend für dieses Modell ist, daß die GTPase-Aktivität von Dynamin durch die GTPase-Effektor-Domäne angeschaltet wird. Dabei rekrutiert und/oder aktiviert der Dynamin-GTP-Komplex, der auf dem Vesikel lokalisiert ist, Effektor-Proteine, die anschließend Dynamin zum Hals des entstandenen Vesikels rekrutieren, wodurch der Vesikel letztendlich abgeschnürt wird (Abb. 1.3).

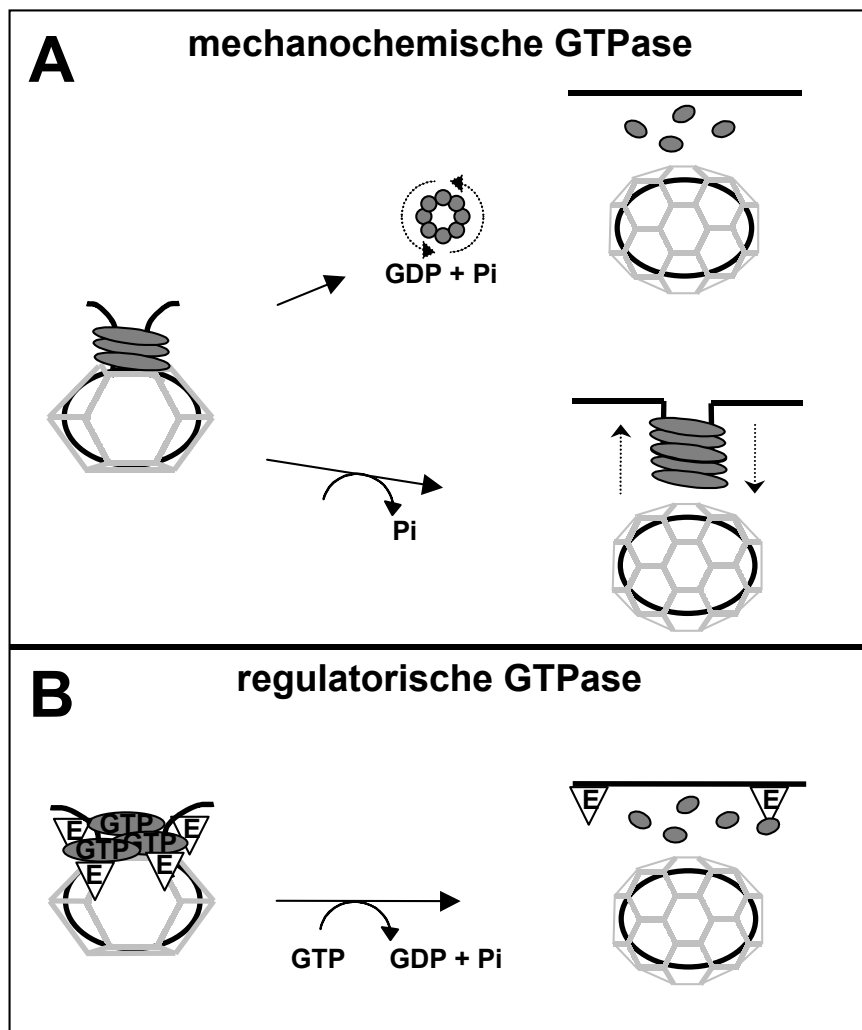


Abb. 1.3: Modelle zur Funktion von Dynamin bei der Internalisierung von Vesikeln.

In A nutzt Dynamin die chemische Energie aus der GTP-Hydrolyse für die Vesikel-Abschnürung. In B aktiviert und/oder rekrutiert der Dynamin-GTP-Komplex Effektor-Moleküle, um die Vesikel abzuschnüren. Die GTP Hydrolyse wird zur Anordnung von Dynamin um den Hals des entstehenden Vesikels und zur Terminierung der Interaktion benötigt. (Verändert nach Song und Schmid, 2003)

Neben der Internalisierung von Membranrezeptoren sind Dynamine auch an diversen anderen endozytotischen Aufnahmeprozessen beteiligt, wie der Phagozytose, der Makropinozytose und der Caveolin-vermittelten und Caveolin-unabhängigen Endozytose (Conner und Schmid, 2003), wobei jeder dieser Prozesse eine koordinierte Komplexität von molekularen Interaktionen voraussetzt.

Mittels Dynamin-Mutanten (in der GTP-Bindungsstelle) war gezeigt worden, daß diese Proteine bei der CCV-vermittelten Internalisierung von diversen Membranrezeptoren beteiligt sind (Damke *et al.*, 1994; Claing *et al.*, 2000; Szaszák *et al.*, 2002). Dynamin ist auch essentiell für die Internalisierung von mAChRen, sowohl für die CCV-vermittelte Internalisierung der M₁, M₃ und M₄ mAChRen als auch für die nicht CCV-vermittelte Internalisierung des M₂ mAChRs (Roseberry und Hosey, 2000; Werbonat *et al.*, 2000). In die Arrestin- und Dynamin-vermittelte Internalisierung des β_2 -Adrenozeptors ist offensichtlich darüber hinaus die zytosolische Tyrosinkinase c-Src eingeschaltet (Ahn *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999). Es wird angenommen, daß c-Src zunächst am Rezeptor/Arrestin-Komplex an der Membran bindet, dann durch Arrestin aktiviert wird und schließlich Dynamin phosphoryliert. Untersuchungen an M₁, M₃ und M₄ mAChRen zeigten, daß durch die Expression einer Dynamin-1-Mutante, die nicht mehr durch c-Src phosphoryliert werden kann, die Internalisierung dieser Rezeptoren blockiert wird. Dies ließ den Schluß zu, daß diese mAChRen in einem c-Src-, Arrestin- und Dynamin-vermittelten Prozeß über CCV internalisiert werden (Abb. 1.4). Im Gegensatz dazu ist die M₂ mAChR-Internalisierung zwar Dynamin-vermittelt, verläuft jedoch unabhängig von c-Src und Arrestin (Vögler *et al.*, 1999; Roseberry und Hosey, 2000; Werbonat *et al.*, 2000). Zur Zeit ist der exakte Mechanismus, der zur Internalisierung des M₂ mAChRs führt, nicht bekannt.

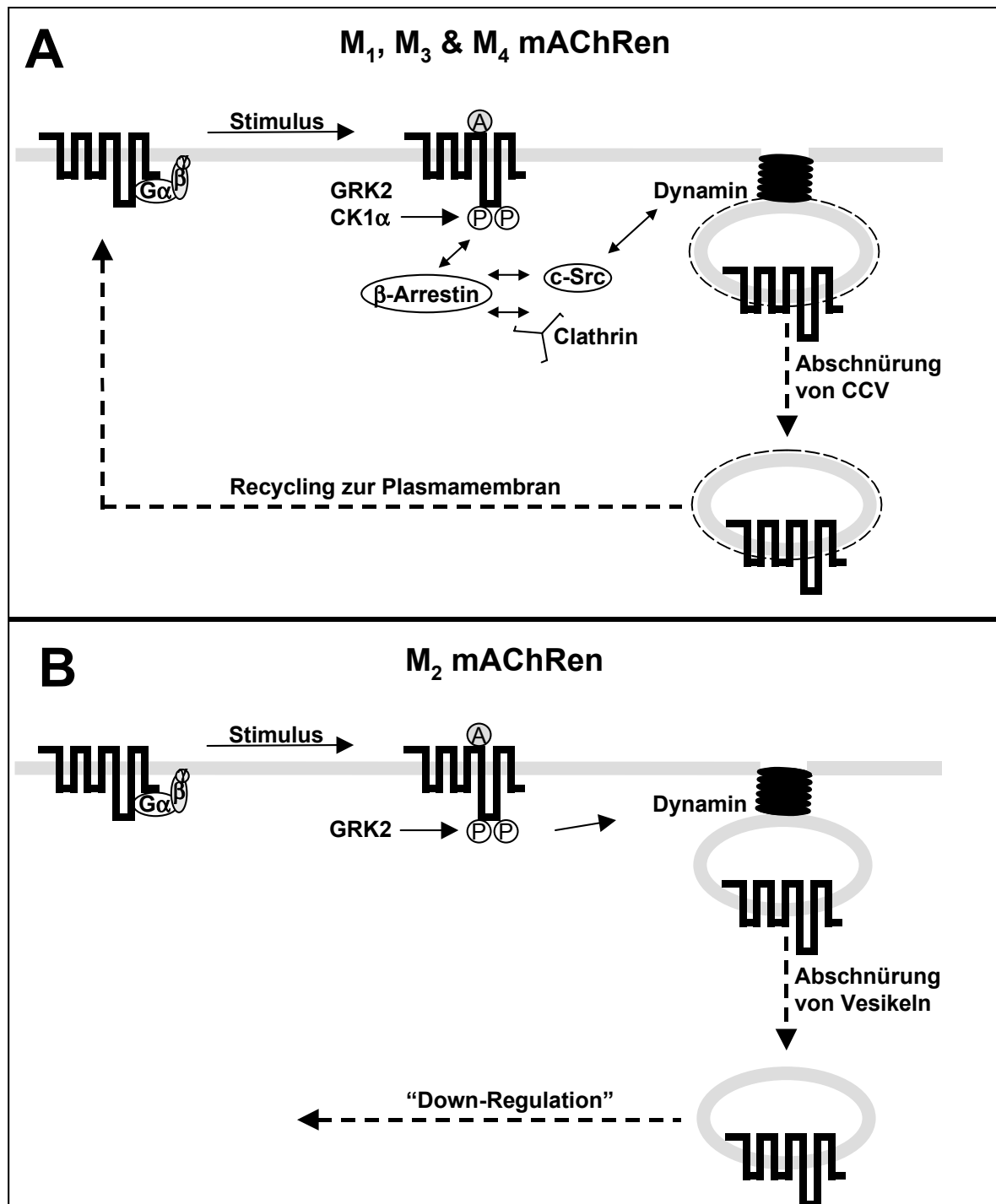


Abb. 1.4: Subtyp-spezifische Internalisierung von mAChRen.

Für weitere Erläuterungen siehe Text.

1.5 Intersectin

Die aus verschiedenen Spezies isolierten und unter den diversen Namen Intersectin, DAP160 und Ese publizierten Multidomänen-Proteine der Intersectin-Familie enthalten zwei N-terminale EH-Domänen (*Eps15 homology*), welche mit Asparagin-Prolin-Phenylalanin-Motiven interagieren können, und fünf hintereinander liegende SH3-Domänen (SH3A bis SH3E), welche mit PRD-Domänen anderer Proteine interagieren (Roos und Kelly, 1998; Hussain *et al.*, 1999; Sengar *et al.*, 1999). Die SH3-Domänen weisen unterschiedliche Bindungsspezifitäten aus. So binden die SH3A-, SH3C- und SH3E-Domänen von Intersectin mit sehr hoher Affinität an die PRD-Domäne von Dynamin (Yamabhai *et al.*, 1998). Weitere Bindungspartner stellen die synaptischen Proteine Synaptojanin und Synapsin dar (Roos und Kelly, 1998). Diese multiplen Interaktionspartner deuten auf eine Schlüsselrolle von Intersectin bei der Endozytose hin. So konnte gezeigt werden, daß Intersectin diverse regulatorische Proteine, darunter Dynamin und AP-2, zur Bildung eines Komplexes zusammenführt, der die Rezeptor-Internalisierung kontrolliert (Yamabhai *et al.*, 1998; Santolini *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999). Durch Überexpression von Intersectin (Ese1) in COS-1 Zellen wird die Endozytose des Transferrin-Rezeptors über CCV inhibiert. Dies resultiert vermutlich aus einer Störung des Gleichgewichtes von diversen Bindungspartnern, die an der CCV-Endozytose beteiligt sind, so daß sich nicht funktionale Proteininteraktionen ergeben (Sengar *et al.*, 1999). Auch die heterologe Expression der isolierten SH3A-, SH3C- und SH3E-Domänen führte zur Inhibition der Internalisierung des Transferrin-Rezeptors. Untersuchungen zur zeitlich vermittelten Wirkung der SH3A-, SH3C- und SH3E-Domänen bzgl. der Bildung von CCV ergaben, daß SH3A sehr frühe Phasen und SH3C und SH3E spätere Phasen inhibieren (Simpson *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2000). Interessanterweise ist Intersectin auch an der Signaltransduktion von Rezeptoren beteiligt (Tong *et al.*, 2000b). So interagiert es mit einem Guanin-nukleotid-Austauschfaktor (mSOS1) für die GTPase Ras und aktiviert darüber MAP-Kinasen. Durch Expression der Intersectin SH3A-E Domänen konnte die Ras-Aktivierung gehemmt werden (Tong *et al.*, 2000a, 2000b). Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß Intersectin offensichtlich bei Endozytose-Prozessen beteiligt ist, aber auch bei Signalübertragungswegen, die wichtig für Zellwachstum und Zelldifferenzierung sind (Adams *et al.*, 2000).

1.6 Endophilin

Verschiedene Gruppen publizierten fast zeitgleich und unabhängig voneinander mehrere Mitglieder der Endophilin-Familie, weswegen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine einheitliche Nomenklatur existiert. Zunächst wurden die murinen Endophilin-Isoformen aufgrund der

vorhandenen SH3-Domäne identifiziert (Sparks *et al.*, 1996). Untersuchungen zu den Expressionsmustern der humanen Endophilin-Isoformen zeigten eine hirnspezifische Expression für Endophilin-1 (SH3p4), eine ubiquitäre Gewebeverteilung für Endophilin-2 (SH3p8) und eine auf Hirn und Testis begrenzte Expression von Endophilin-3 (SH3p13) (Giachino *et al.*, 1997). Der strukturelle Aufbau der drei 40 kDa großen Proteine umfaßt eine konservierte N-terminal gelegene Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase (LPAAT)-Domäne, die über eine *coiled-coil*-Domäne und eine isoformspezifische Region mit einer C-terminalen SH3-Domäne verbunden ist. Von den drei Isoformen ist das hirnspezifisch exprimierte Endophilin-1 bisher am intensivsten charakterisiert worden. Über die SH3-Domäne interagiert Endophilin-1 mit Dynamin und Synaptojanin (Micheva *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997). Die Homodimerisierung von Endophilin-1 und die Heterodimerisierung zwischen Endophilin-1 und Endophilin-2 wird über die *coiled-coil*-Domäne realisiert (Ringstad *et al.*, 2001).

Durch die LPAAT-Domäne verfügt Endophilin-1 über eine Lysophosphatidsäure-Acyl-Transferase-Aktivität, wodurch es die Synthese von Phosphatidsäure aus Lysophosphatidsäure und Acyl-CoenzymA katalysiert (Schmidt *et al.*, 1999). Es wird angenommen, daß Endophilin-1 hierüber die Membrankurvatur verändert und so zur Abschnürung der Vesikel beiträgt. Als Modell wird dabei angenommen, daß die eher kegelförmige Phosphatidsäure auf der zytoplasmatischen Seite der Lipiddoppelschicht die Invaginierung der Membran erleichtert, da sie einen deutlich geringeren Wölbungsradius zuläßt als Lysophosphatidsäure, und somit die Abschnürung der Vesikel erreicht wird (Schmidt *et al.*, 1999; Huttner und Schmidt, 2000). Andere Arbeitsgruppen konnten dagegen zeigen, daß die LPAAT-Aktivität und die Interaktion von Endophilin mit Dynamin entbehrlich sind, um Membranvesikel abzuschnüren, da gereinigtes Endophilin allein in der Lage war, die Membrankurvatur zu verändern (Farsad *et al.*, 2001). Zusätzlich zur Bindung an Dynamin interagiert Endophilin über die SH3-Domäne mit der Inositol-5-Phosphatase Synaptojanin und aktiviert diese (Hill *et al.*, 2001), was zur Absenkung des PIP₂-Gehaltes an der Membran führt. Auch dies könnte über die bekannten Wirkungen von PIP₂ auf Clathrin, AP-2 und Dynamin zur Abschnürung der Vesikel von der Membran führen. Es ist also möglich, daß Endophilin über verschiedene Wirkungen zur Abschnürung der Vesikel von der Membran beiträgt (Reutens und Begley, 2002).

Darüber hinaus konnte auch die Beteiligung von Endophilin bei der Vesikel-Reifung gezeigt werden. Durch Mikroinjektion von Endophilin-Antikörpern konnte ein frühes Stadium des endozytotischen Prozesses gehemmt werden (Ringstad *et al.*, 1999). Wird jedoch die C-terminale SH3-Domäne durch Mikroinjektion von prolinreichen Peptiden blockiert, können

sowohl tief invaginierte als auch clathrinumhüllte Vesikel beobachtet werden (Gad *et al.*, 2000). Des weiteren konnte auch die Vesikel-Abschnürung durch die Mikroinjektion der SH3-Domäne von Endophilin blockiert werden, wobei sich Intermediate mit verlängerten Vesikelhälsen bildeten, die von Dynaminringen umgeben waren (Simpson *et al.*, 1999).

Neben den schon erwähnten Bindungspartnern von Endophilin sind weitere Proteine bekannt, die nicht an der Entstehung von CCV beteiligt sind, die aber mit Endophilin interagieren. Indirekt moduliert Endophilin über die Interaktion zur rGLK (*rat germinal center kinase-like kinase*) und die damit verbundene Aktivierung der JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg (Ramjaun *et al.*, 2001). Durch die Interaktion mit membranverankerten Metalloproteasen, die an der Zell-Adhäsion und Wachstumsfaktor-Signalwegen beteiligt sind, kann Endophilin möglicherweise die Verbindung zu weiteren Proteinen der Endozytose herstellen (Howard *et al.*, 1999). Endophilin-1 ist auch bei der Internalisierung und Signalweiterleitung des EGF-Rezeptors über die Interaktion mit dem Cbl-Interaktionsprotein beteiligt (Petrelli *et al.*, 2002; Soubeyran *et al.*, 2002).

Studien am β_1 -Adrenozeptor, einem typischen GPCR, zeigten, daß Endophilin-1 an die dritte intrazelluläre Schleife des aktivierten Rezeptors bindet und dadurch die Internalisierung des Rezeptors und die Signalweiterleitung zur Adenylylcyclase beeinflusst (Tang *et al.*, 1999). Durch die Überexpression von Endophilin-1 wurde die Internalisierungsrate des Rezeptors erhöht und die Kopplung zum $G\alpha_s$ -Protein verringert. Es wird daher vermutet, daß Endophilin-1 als Adapter-Protein den β_1 -Adrenozeptor mit endozytotischen Proteinen verbindet und so für das Recycling des β_1 -Adrenozeptors verantwortlich ist.

1.7 Ubiquitylierung von Proteinen

Der Abbau von Proteinen ist eine essentielle Funktion von eukaryontischen Zellen. Es existieren zwei wichtige proteolytische Systeme in der Zelle, das lysosomale und das proteasomale System (Bonifacino und Weissman, 1998). Die Lysosomen sind an der Plasmamembran lokalisiert und verfügen über diverse saure Hydrolasen sowie proteolytische Enzyme, die auch an der Down-Regulation von internalisierten Membranrezeptoren beteiligt sind (Bohley und Seglen, 1992). Das Proteasom ist ein Multi-Protein-Komplex der im Zytoplasma, im Zellkern und auch assoziiert an subzellulären Organellen zu finden ist (Coux *et al.*, 1996; Voges *et al.*, 1999; Hirsch und Ploegh, 2000). Das Proteasom degradiert nicht unspezifisch zelluläre Proteine, sondern spezifisch ubiquitylierte Proteine.

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes 76 Aminosäuren großes Polypeptid, daß in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird (Wilkinson, 1995). Am Prozeß der Ubiquitinylierung, d.h. der kovalenten Konjugation von Ubiquitin-Molekülen, sind drei unterschiedliche Enzyme (E1s, E2s und E3s) beteiligt. E1s sind die Ubiquitin-aktivierenden Enzyme, E2s sind die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und E3s sind die Ubiquitin-Protein-Ligasen (Hershko und Ciechanover, 1998). Zunächst aktiviert E1 Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Schritt, indem eine Thiol-Esterbindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin zu E1 gebildet wird. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin auf einen spezifischen Cystein-Rest des konjugierenden Enzyms E2 transferiert. Durch die Bindung von E2 zur Ubiquitin-Ligase E3 wird schließlich die Übertragung des aktivierten Ubiquitin auf das Zielsubstrat katalysiert (Abb. 1.5). Ubiquitin kann direkt vom E2 oder indirekt über E3 auf einen spezifischen Lysin-Rest des Substrates übertragen werden. Dies ist abhängig vom beteiligten E3 Enzym, von dem zwei Familien bekannt. Liegen E3 Enzyme mit einer HECT-Domäne (*homologous to E6-AP carboxyl terminus*) vor, wird das aktivierte Ubiquitin zunächst auf E3 transferiert und dann auf das Substrat. Sind Mitglieder mit einer RING-Finger-Domäne von E3 beteiligt, so wird Ubiquitin direkt vom E2 auf das Substrat übertragen (Weissman, 2001). Auch die Polymerisierung von Ubiquitin-Isopeptidketten wird über diese Enzym-Kaskade katalysiert (Abb. 1.5). Die Spezifität dieses Prozesses wird über das Zusammenspiel der einzelnen Enzyme bestimmt. Die E3 Enzyme sind entweder alleine oder in Kombination mit den E2 Enzymen für die Substraterkennung verantwortlich (Weissman, 2001).

Die Multi-Ubiquitinylierung der Substrate stellt das Signal für den proteasomalen Abbau dar, wobei mindestens vier Ubiquitin-Moleküle vorhanden sein müssen (Voges *et al.*, 1999; Hicke, 2001) (Abb. 1.5). Die Isopeptidkette wird ausgehend vom Lysin-Rest des Substrat-gebundenen Ubiquitins an Position 48 zum nachfolgenden Glycin-Rest von Ubiquitin an Position 76 gebildet. Findet die Polymerisierung der Ubiquitinkette an den Lysin-Resten der Aminosäurepositionen 11, 29 oder 63 von Ubiquitin statt, so sind dies keine Signale für den proteosomalen Abbau des Substrates, sondern stellen Signale für andere zelluläre Funktionen dar (Hicke, 2001; Weissman, 2001). Der Ubiquitin-Proteasom-Komplex ist nicht nur an der Degradation von Proteinen beteiligt. So ist er offensichtlich auch an der Transkriptionskontrolle von bestimmten Genen beteiligt (Muratani und Tansey, 2003). Des weiteren kann auch die Aktivität von Proteinen durch die Ubiquitinylierung moduliert werden. So konnte *in vitro* gezeigt werden, daß die Aktivität von Calmodulin durch die Ubiquitinylierung signifikant erniedrigt wird (Laub *et al.*, 1998).

Darüber hinaus ist das Ubiquitin-Proteasom-System auch an der Regulation der Endozytose von einigen Membranproteinen beteiligt (Strous und Govers, 1999). Diverse Studien zur Internalisierung und zum Abbau von Rezeptoren in Säugerzellen konnten zeigen, daß die Ubiquitinylierung die Agonist-abhängige Endozytose und den Abbau von Rezeptoren vermittelt. Dabei können der Rezeptor und/oder eine Adapter-Protein ubiquitinyliert werden. Zu den Rezeptoren, deren Internalisierung bzw. Abbau durch Ubiquitinylierung reguliert wird, gehören verschiedene Tyrosinkinase-Rezeptoren (Mori *et al.*, 1992, 1995; Galcheva-Gargova *et al.*, 1995; Strous *et al.*, 1996; van Kerkhof *et al.*, 2000) sowie mehrere GPCRen, wie der CXCR4-Rezeptor (Marchese und Benovic, 2001), der δ -Opioid-Rezeptor (Petäjä-Repo *et al.*, 2001) und der β_2 -Adrenozeptor (Shenoy *et al.*, 2001). Der Abbau der Rezeptoren kann dabei sowohl in Lysosomen (β_2 -Adrenozeptor) als auch über das Proteasom (δ -Opioid-Rezeptor) erfolgen. Die genauen Mechanismen, die zur Ubiquitin-vermittelten Internalisierung bzw. zum Abbau von Rezeptoren führen, sind nicht bekannt.

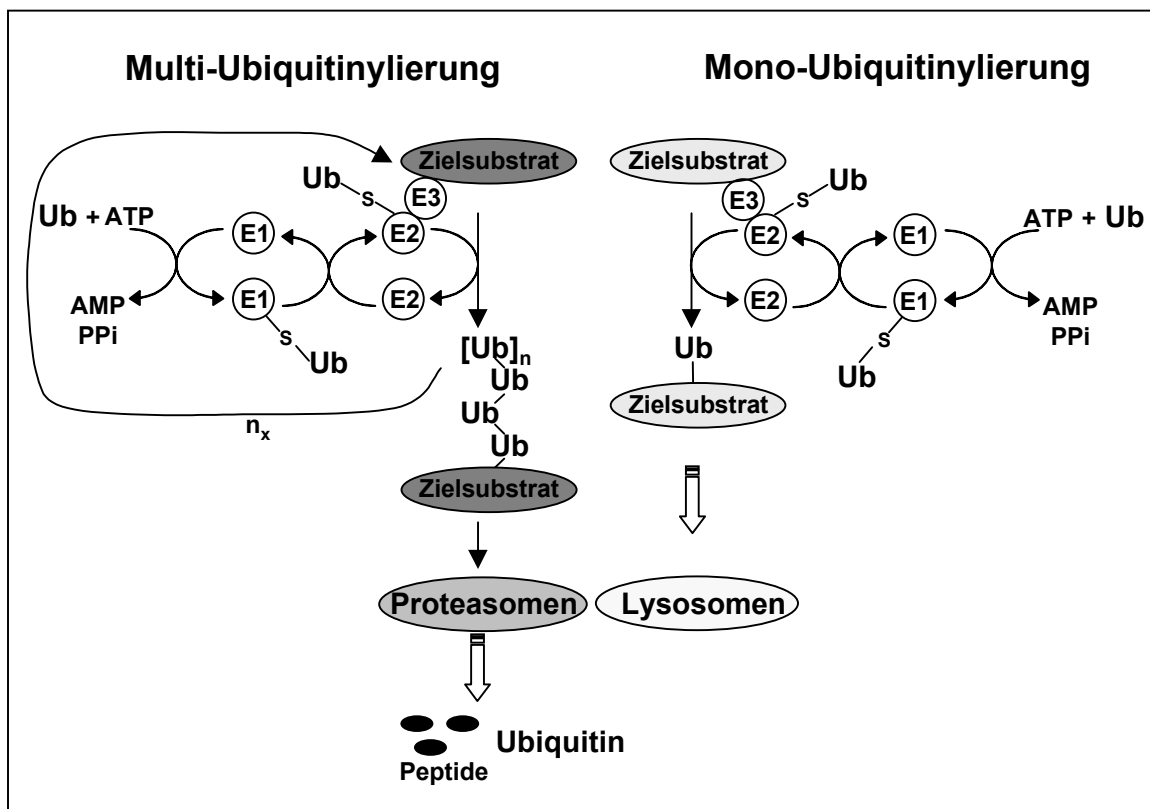


Abb. 1.5: Ubiquitinylierung von Proteinen und ihre Rolle beim Proteinabbau.

Die multi-ubiquitinylierten Substrate werden im Proteasom proteolytisch gespalten, während die Mono-Ubiquitinylierung eher das Signal für den Abbau der Zielsubstrate in Lysosomen darstellt.

(Modifiziert nach Kornitzer und Ciechanover, 2000)

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund, daß die Mechanismen der Internalisierung der mAChR-Subtypen M_1 - M_4 und die dabei beteiligten Proteinkomponenten offensichtlich sehr unterschiedlich waren. Dies betraf insbesondere die Proteinkomponenten Arrestin, c-Src und Clathrin, die zwar bei der Internalisierung von M_1 , M_3 und M_4 mAChRn, nicht jedoch bei der des M_2 mAChRs eingeschaltet waren. Weiterhin war bekannt, daß der internalisierte M_2 mAChR intrazellulär abgebaut wird, während die anderen mAChR-Subtypen wieder an die Plasmamembran zurückkehren (Vögler *et al.*, 1998, 1999; Krudewig *et al.*, 2000; Werbonat *et al.*, 2000; van Koppen, 2001).

In den letzten Jahren wurden verschiedene neue Proteine identifiziert, die bei der Internalisierung und/oder beim Abbau von GPCRen beteiligt zu sein scheinen. Dazu gehören Rezeptorkinasen wie die $CK1\alpha$, Proteine, die bei der direkten Rezeptor-Endozytose beteiligt sind, wie Intersectin und Endophilin, und solche, die offensichtlich beim Rezeptor-Abbau eine Rolle spielen, wie Ubiquitin. Hinsichtlich einer Beteiligung dieser Proteine bei der Internalisierung und beim Abbau von mAChRen war wenig oder nichts bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zunächst die Rolle der beiden Rezeptorkinasen GRK2 und $CK1\alpha$ bei der Internalisierung von mAChRen (M_1 - M_4) und eventuelle Unterschiede in funktionellen Zellantworten näher zu charakterisieren. Um den Prozeß der Internalisierung der mAChR-Subtypen weiter differenzieren zu können, wurden die Effekte der zwei Multidomänen-Proteine Intersectin und Endophilin untersucht. Schließlich sollte die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes bei der Internalisierung und beim Abbau der mAChR-Subtypen untersucht werden. Aus den Daten sollte möglicherweise ein differenzierteres Modell der Internalisierung und des Abbaus der mAChR-Subtypen entwickelt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Lieferantenfirma</u>
Acrylamid	Serva
Ameisensäure	J.T. Baker
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumformiat	Sigma
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Günenthal
Aprotinin	Sigma
ATP	Roche Molecular Biochemicals
Atropin	Sigma
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamid	Serva
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
1-Butanol	J.T Baker
Carbachol	Sigma
CHAPS	Roth
Chloroform	J.T Baker
Chloroquin	Sigma
Cycloheximid	Sigma
Coomassie-Blau	Serva
Diethylether	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Serva
DMEM/Nutrient Mix F-12	Invitrogen
dNTP Mix	Stratagene
ECL-Immunoblot-Reagenz	Pierce
EDTA	Merck
EGTA	Merck

Essigsäure	J.T Baker
Ethanol	J.T Baker
Ethylacetat	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Fettfreies BSA	Sigma
FuGENE 6	Roche Molecular Biochemicals
Fura-2/AM	Molecular Probes
Geneticin (G418)	Invitrogen
D(+)-Glukose	Merck
GDP	Roche Molecular Biochemicals
Glutathion-Sepharose Beads	Pharmacia
GTP γ S	Roche Molecular Biochemicals
Glycerol	Fluka
Glycin	Sigma
HEPES	Serva
Iod	Merck
Inositolfreies DMEM	Invitrogen
Isooktan	J.T Baker
Isopropanol	J.T Baker
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma
Kupfersulfat	Merck
Lactacystein	Calbiochem
LB-Agar	Invitrogen
LB-Medium	Invitrogen
Leupeptin	Sigma
Lithiumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Molekulargewichtsstandards (Protein)	Sigma
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumacetat	Merck

Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Phosphatidsäure (PA)	Sigma
Paraffinöl	Sigma
Penicillin	Grüenthal
Petrolbenzin	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂)	Roche Molecular Biochemicals
Phosphatidylethanol (PtdEtOH)	Avanti
Phosphatidylethanolamin	Sigma
Phosphorsäure (85%)	Merck
Poly-L-Lysin (>300.000 Da)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Saccharose	Fluka
Salzsäure (38%)	Merck
SDS	Serva
Serva-Blau (G und R)	Serva
SOC-Medium	Invitrogen
Sojabohnen-Trypsininhibitor	Sigma
Streptomycin	Grüenthal
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
TEMED	Serva
Tetracyclin	Sigma
Tris	Merck
Triton X-100	Roth
Tween20	Sigma

2.1.2 Radioaktive Chemikalien

<u>Name (spezifische Radioaktivität)</u>		<u>Hersteller</u>
[³⁵ S]GTPγS	(1250 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
[³ H]Inositol-1,4,5-trisphosphat	(21 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
<i>myo</i> -[2- ³ H]Inositol	(24,4 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
<i>N</i> -[³ H]Methylscopolamin	(80 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences

[9,10- ³ H]Ölsäure	(10 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
[³² P]Orthophosphat	(10 mCi/ml)	Amersham/Pharmacia
[³ H]Quinuclidinylbenzilat	(45 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences

2.1.3 Antikörper und Enzyme

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
anti-CK1 α -Antikörper des Kaninchens	Dr. A. Tobin (Leicester, UK)
anti-Endophilin-I-Antikörper der Ziege	Santa Cruz
anti-GRK2-Antikörper des Kaninchens	Santa Cruz
anti-FLAG-Antikörper der Maus	Stratagene
anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Konjugat der Ziege	Sigma
anti-M ₂ mAChR-Antikörper des Kaninchens	Chemicon
anti-M ₃ mAChR-Antikörper des Kaninchens	Dr. A. Tobin
anti-Maus IgG/FITC Konjugat des Schafs	Sigma
anti-Maus IgG/Peroxidase-Konjugat der Ziege	Dianova
anti-Maus IgG/TRITC Konjugat des Schafs	Sigma
anti- <i>myc</i> -Antikörper der Maus (9E10 Klon)	Calbiochem
anti-phospho-ERK1/2-Antikörper des Kaninchens	Cell Signaling
anti-Ubiquitin-Antikörper des Kaninchens	Calbiochem
anti-Ziege IgG/TRITC Konjugat des Kaninchens	Sigma
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen

2.1.4 Plasmide

<u>Name</u>	<u>Referenz</u>
pcDNA3.1	Invitrogen
pCD-PS	Drs. Okayana & Berg (Stanford)
pCMV3 tagB	Stratagene
pRK5	Dr. A. Ullrich (Martinsried)
m1 mAChR in pCD-PS	Dr. N.M Nathanson (Seattle)
m2 mAChR in pCD-PS	Dr. N.M Nathanson
m3 mAChR in pCD-PS	Dr. N.M Nathanson
m4 mAChR in pCD-PS	Dr. C.J. van Koppen
Δ m4 mAChR in pCD-PS Maus	Dr. C.J. van Koppen

Endophilin 1 in pEXfox(+)	Dr. B. Kay (Wisconsin)
SH3-Domäne von Endophilin in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
WT Intersectin short-Isoform FLAG-tag in pRK5	Dr. P. McPherson (Montreal)
Intersectin SH3A-Domäne in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
Intersectin SH3B-Domäne in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
Intersectin SH3C-Domäne in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
Intersectin SH3D-Domäne in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
Intersectin SH3E-Domäne in pGEX-2TK	Dr. B. Kay
N-Terminale SH3 Grb2 in pCMV5c-myc	Dr. H. McMahon (Cambridge)
Dynamin in pCMV96-7	Dr. J.P. Albanesi (Dallas)
β -ARK-ct (495-689) in pRK5	Dr. R.J. Lefkowitz (Durham)
G α_t in pCis	Dr. T. Wieland (Mannheim)
CK1 α in pcDNA3	Diese Arbeit
CK1 α K46A in pcDNA3	Dr. A. Tobin
I3M ₃ mAChR-Schleife (345-463) in pcDNA3	Dr. A. Tobin
GRK2 in PEF/BOS	Dr. T. Haga (Tokyo)
GRK2 K220W in pEF/BOS	Dr. T. Haga
Ubiquitin His ₆ - und c-myc tags in pRBG4	Dr. R. Kopito (Stanford)
Ubiquitin K48R His ₆ - und c-myc tags in pRBG4	Dr. R. Kopito

2.1.5 Sonstige Materialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Anionentauscher AG 1-X8	Bio-Rad
Anionentauscher AG 50-X8	Bio-Rad
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Dünnschichtchromatographie Kieselgelplatten 60 C	Merck
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Emulsifier Scintillator Plus/299	Packard
Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE	Agfa
Filmfixier Lösung Agfix	Agfa
GF/C Filter	Whatman
Kodak X-OMAT AR-Film	Kodak
Nitrocellulosemembranen	Advanced Microdevices
Plasmid Mega Kit	Qiagen

Plastik-Einmalküvetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Sterilfilter (0,20 µm)	Sartorius
Szintillationsgefäße	Packard
Zellkulturschalen und -platten	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank mit laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt. Die dazu erforderlichen Arbeitsmaterialien und Lösungen wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min bzw. durch Sterilfiltration sterilisiert. Pipetten, Zellkulturschalen und andere Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur bestanden aus sterilem Einwegmaterial.

Die Kultivierung der HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen wurde in einem Heraeus Brutschrank (B5060 EK/CO₂) auf 150 mm Zellkulturschalen bei 37°C mit einer feuchten Atmosphäre aus 95% Luft und 5% CO₂ durchgeführt. Als Nährmedium wurde DMEM/F12 mit 10% (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin benutzt. Bei stabil transfizierten HEK293-Zellen wurde zur Selektion dieser Zellen zusätzlich das Neomycin-Analogon Geneticin (G418) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml zugefügt. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen auf 35 mm bzw. 60 mm Zellkulturschalen oder 12 bzw. 24 Lochplatten ausgesät. Zuvor wurden die Zellschalen mit 0,0025% (m/v) Poly-L-Lysin (MW >300 kDa) für 30 min vorbehandelt, gespült und getrocknet, um ein besseres Anhaften der Zellen zu erreichen.

Für die Lagerung in flüssigen Stickstoff wurden die Zellen abgelöst, mit 1.700 Upm 5 min bei RT abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R) und in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO im Nährmedium) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und für 24 h bei -70°C in einer geschlossenen Styroporbox zwischengelagert, bevor sie schließlich in flüssigen Stickstoff überführt wurde. Zum Ausfrieren der Zellen wurden diese zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und das DMSO durch Zentrifugation (s.o.) entfernt. Die Zellen wurden insgesamt in 20 ml DMEM/F12 auf einer 150 mm Zellkulturschale kultiviert (s.o.).

2.2.2 *E. coli*-Kultivierung

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden autoklavierte LB-Flüssigmedien bzw. LB-Agarplatten verwendet. Die Selektion von plasmidtragenden *E. coli*-Stämmen mit einer plasmidkodierten Antibiotikaresistenz erfolgte durch die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums ins Medium. Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Warmluftschüttler (Braun Certomat) bei 160 Upm angezogen.

Antibiotika Konzentrationen für *E. coli*-Medien:

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	10 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

2.2.3 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien

(Asubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989)

Unter sterilen Bedingungen (Heraeus Microflow Klasse 2 Sicherheitswerkbank) wurden 500 ml mit einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes DH5α (Hanahan, 1983) angeimpft und die Kultur bei 37°C im Warmluftschüttler bei 160 Upm bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 590 nm von ca. 0,4-0,5 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C für 5 min bei 4.000 Upm zentrifugiert (Sorvall RC-5B). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Bakterien in 8 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 8 ml einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung mit 40% (v/v) Glycerol. Nach Aliquotierung (200 µl) wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente *E. coli*-DH5α mit 1-2 µg cDNA vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C wurden 700 µl SOC-Medium zugesetzt und 1 h im Warmluftschüttler (Braun Ceromat; 160 Upm) bei 37°C inkubiert. Aliquots des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Memmert GTR 0241) inkubiert.

2.2.4 DNA-Transfektion von HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurde bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert und einen Tag zuvor mit frischen Nährmedium versorgt. Die entsprechenden Mengen an rekombinanter Plasmid-cDNA wurden durch eine Ethanol-Präzipitation sterilisiert. Dazu wurde das DNA-Gemisch in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat angesäuert und die DNA durch Zugabe von 250 µl 100% Ethanol präzipitiert (4°C). Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 13) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft in einer sterilen Sicherheitswerkbank getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 250 µl sterilem Wasser aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zusammen mit 250 µl steriler 2 M CaCl₂-Lösung überführt. Zum cDNA/CaCl₂-Gemisch wurden tropfenweise 2,5 ml 2x HeBS und 2 ml steriles dH₂O gegeben, sofort gemischt und für 20 min bei RT stengelassen, um die DNA zu präzipitieren. Auf die Zellkulturschalen wurden 10 µl 10 mM Chloroquin-Lösung pro ml Medium gegeben, um den Abbau der DNA in den Lysosomen zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von etwa 5 min wurde das cDNA/Calciumphosphat-Präzipitat auf den Zellkulturschalen verteilt, und die Zellen wurden 3 bis 5 h im Brutschrank mit dem gebildeten Präzipitat inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden dreimal mit jeweils 14 ml sterilem HBS gewaschen und schließlich mit 20 ml frischem DMEM/F12 versorgt. Je nach Experiment wurden die Zellen entweder nach 24 oder 72 h auf neue Zellkulturplatten gesplittet. Die Zellen wurden mit Selektionsmedium inklusive 1 mg/ml G418 versorgt, um Zellklone zu isolieren, in denen die transfizierte DNA stabil im Chromosom eingebaut ist (siehe 2.2.6)

2x HeBS, pH 7,05 (steril filtriert):

280	mM NaCl
50	mM HEPES
1,48	mM Na ₂ HPO ₄

HBS, pH 7,4 (steril filtriert):

113	mM NaCl
25	mM HEPES
5,5	mM Glukose
5	mM MgCl ₂
2,7	mM KCl
1,8	mM CaCl ₂
1	mM NaH ₂ PO ₄

2.2.5 DNA-Transfektion mittels FuGENE 6-Reagenz

Ein Tag vor der Transfektion wurden die HEK293-Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen gesplittet und bis zu 50-60% Konfluenz in Serum-depletiertem DMEM/F12 kultiviert. Die zu transfizierende Plasmid-cDNA (0,5-1 µg) wurde vor der Transfektion präzipitiert (siehe 2.2.4). 100 µl serumfreies DMEM/F12 wurden mit 6 µl Transfektionsreagenz FuGENE 6 in einem 2 ml Kryoröhrchen versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,5-1 µg DNA zu dem Ansatz gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise zu den Zellen gegeben, und die Zellen wurden für weitere 48 h bis zum Experiment inkubiert.

2.2.6 Isolierung einzelner G418-resistenter HEK293-Zellklone

Zur Herstellung von Zelllinien, bei denen die transfizierte DNA stabil im Chromosom eingebaut vorliegt, wurden HEK293-Zellen mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert. Der pcDNA3-Vektor verfügt über einen SV40-Promotor und enthält das Neomycinphosphotransferase-Gen, welches die Selektion der transfizierten Zellen auf der Basis der Resistenz für das Antibiotikum Geneticin (G418) ermöglicht.

Nach Selektion und Kultivierung der polyklonalen, G418-resistenten Zellen erfolgte die Vereinzelung individueller Zellklone. Die G418-resistenten Zellen wurden von den Platten abgelöst, auf 60 mm Zellkulturschalen isoliert und mit sog. *conditioned medium* 1-2 Wochen im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Das *conditioned medium* besteht aus 1 mg/ml G418, 50% frisches DMEM/F12 mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin und 50% DMEM/F12, indem die polyklonalen Zellen bereits inkubiert worden waren. Das Medium wurde vor dem Mischen mit dem frischen Medium zentrifugiert und steril filtriert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen auf 150 mm Schalen in Anwesenheit von 500 µg/ml G418. Für die anschließenden Experimente wurden die Zellen unter einem Selektionsdruck von 300 µg/ml G418 gehalten, und spätestens 20 h vor dem jeweiligen Experiment wurde das G418 aus dem Kulturmedium entfernt.

2.2.7 DNA-Techniken

2.2.7.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation und Aufreinigung von plasmidkodierter cDNA wurde eine flüssige *E. coli*-Vorkultur in SOC-Medium mit Antibiotikum angeimpft und ca. 8 h bei 37°C im Wärmelufschüttler mit 160 Upm angezogen. Anschließend wurde die Bakterienkultur in größere Volumina antibiotikumhaltigen LB-Flüssigmedium überführt und unter gleichen Bedingungen wie oben kultiviert. Bei Stämmen mit *low-copy* oder *high-copy* Plasmiden wurden 6 L bzw. 3 L LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 6.000 Upm bei 4°C für 10 min pelletiert (Sorvall RC-5B). Die Aufreinigung der Plasmid-cDNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Mega-Kit der Firma Qiagen. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die Bakterienpellets bei *low-copy* Plasmiden in 180 ml P1 Puffer resuspendiert und mit 180 ml P2 Puffer versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 180 ml eiskaltem P3 Puffer. Ansonsten erfolgte die Präparation nach Angaben des Herstellers. Die präzipitierte DNA wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen und bei –20°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde durch UV-Spektrophotometrie in Quarzküvetten in einem Pharmacia Spektrophotometer Ultrospec II bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

TE-Puffer, pH 8,0:	1	mM EDTA
	10	mM Tris/HCl

2.2.7.2 Gerichtete Mutagenese

Zur gerichteten Mutagenese von Aminosäuren wurden Oligonukleotide mit entsprechendem Basenaustausch (Wildtypsequenz zur Basenmismatch-Sequenz der Caseinkinase 1 α K46A) synthetisiert. Die gerichtete Mutagenese erfolgte mittels des Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene nach Angaben des Herstellers. Folgende Bedingungen wurden für die PCR (Polymerase Chain Reaction; Pharmacia Gene ATAQ Controller) eingestellt.

PCR-Ansatz:

5	μ l 10x Reaktionspuffer
5-50	ng dsDNA Template
125	ng Primer 1 und 2
1	μ l dNTP Mix
1	μ l <i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase

ad 50 μ l dH₂O

PCR-Programm:

1	95°C, 1 min Denaturierung
2	95°C, 30 sec Denaturierung
3	55°C, 1 min Annealing
4	68°C, 14 min Elongation
5	zu Schritt 2, 14 Zyklen

Es sollte in der Sequenz der dominant-negativen Mutante der Caseinkinase 1 α die mutierte Aminosäure in Position 46 von Arginin zur Wildtyp-Aminosäure Lysin geändert werden. Dazu wurden die zwei folgenden Oligonukleotide von der Firma Invitrogen bestellt.

5' gaggaggtggcagtg~~aaa~~ctagaatcccagaaggcga 3' Primer 1 CK1 α WT

5' cgccttctctgggattctag~~ttt~~cactgccacctcct 3' Primer 2 CK1 α WT

Es konnten drei Klone isoliert werden, die über die plasmidkodierte cDNA-Sequenz vom Wildtyp der Caseinkinase 1 α verfügten. Die Identität der Klone wurde durch DNA-Sequenzierung der Plasmide durch die Firma SEQLAB GmbH (Göttingen) bestätigt.

2.2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die entsprechenden Proteinproben in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, mit dH₂O auf ein Volumen von 800 μ l aufgefüllt, mit 200 μ l Bradfordreagenz vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde eine Eichreihe mit einer Proteinkonzentration von 0,4 bis 2,0 μ g/ml mit Rinder- γ -Globulin als Standard erstellt. Die Proben wurden nacheinander in Polystyrol-Einwegküvetten gefüllt und bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (Pharmacia LKB Biochrom Ultrospec II). Der Proteingehalt der Proben wurde über die ermittelte Eichreihe berechnet.

Bradfordreagenz:	350	mg Serva-Blau G (Coomassie Blau)
	250	ml Ethanol
	250	ml 85% Phosphorsäure
	ad 1 l dH ₂ O	

2.2.8.2 BCA-Proteinbestimmung

Die BCA-Methode dient zur Proteinbestimmung von Proben in detergenzienhaltigen Lösungen (z.B. Lysis-Puffer). Dazu wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm (Pharmacia LKB Biochrom Ultrospec II). Die Proteinkonzentration wurde über eine Eichgerade (0,1-2 μ g/ml Proteingehalt) errechnet.

2.2.8.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die auf 60 mm Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurden 48 h nach der Transfektion ohne oder mit Carbachol in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in Laemmli-Puffer lysiert (siehe 2.2.8.6). Nach Bestimmung des Proteingehaltes mittels der BCA-Methode wurden identische Proteinmengen zur Auftrennung auf das Gel aufgetragen.

Die SDS-PAGE wurde in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Life Technologies V 15-17) durchgeführt. Für die Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt, mittels TEMED und Ammoniumpersulfat (10%) polymerisiert. Zunächst wurde das Trenngel (Acrylamidkonzentration von 8-15%) in die zuvor zusammengebaute Gelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel (Acrylamidkonzentration konstant 6%) darüber gegossen. Der eingesetzte Taschenformer wurde nach der Polymerisation entfernt und das Gel wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer installiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 95°C (Eppendorf Thermoblock) in Laemmli-Puffer erhitzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 38 mA für etwa 4 h. Die Gele mit den aufgetrennten Proteinen wurden entweder geblottet (2.2.8.5) oder mittels Coomassie-Blau-Färbung (2.2.8.4) angefärbt. Gele mit phosphorylierten Proteinen (2.2.8.7) wurden bei 80°C für 90 min im Vakuum-Geltrockner (Bio-Rad GelDryer Model 543) getrocknet.

Zusammensetzung der Molekulargewichtsstandards (Sigma):

Proteine	MW (kDa)	Low molecular weight standard LMW	high molecular weight standard HMW
Myosin	205		X
β-Galactosidase	116		X
Phosphorylase b	97		X
BSA	66	X	X
Ovalbumin	45	X	X
Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase	36	X	
Carboanhydrase	29	X	X
Trypsinogen	24	X	
Sojabohnen-Trypsininhibitor	20	X	
Lactalbumin	14	X	
Acrylamid Lösung 30%:	150 g Acrylamid 4 g Bisacrylamid ad 500 ml dH ₂ O		
2x Laemmli-Puffer:	10% (v/v) Glycerol 4% (m/v) SDS 2% (v/v) 2-Mercaptoethanol		

	0,0006% (m/v) Bromphenolblau		
2x Trenngelpuffer, pH 8,8:	0,2%	(m/v) SDS	
	750	mM Tris/HCl	
2x Sammelgelpuffer, pH 6,8:	0,2%	(m/v) SDS	
	250	mM Tris/HCl	
Laufpuffer:	1%	(m/v) SDS	
	200	mM Glycin	
	20	mM Tris	
Zusammensetzung 10% Trenngel:	Acrylamid 30%	12,5	ml
	2x Trenngelpuffer	18,75	ml
	dH ₂ O	6,25	ml
	TEMED	75	µl
	APS 10%	150	µl
Zusammensetzung 6% Sammelgel:	Acrylamid 30%	2	ml
	2x Sammelgelpuffer	5	ml
	dH ₂ O	2,9	ml
	TEMED	10	µl
	APS 10%	100	µl

2.2.8.4 Coomassie-Blau-Färbung

Das Gel wurde für 60 min in Coomassie-Blau-Färbelösung inkubiert und für 2 h bei ständigem Schütteln entfärbt. Anschließend waren die Proteinbanden sichtbar.

Coomassie-Lösung:	1,4%	(w/v) Serva-Blau R
	50%	(v/v) Methanol
	10%	(v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10%	(v/v) Essigsäure
	10%	(v/v) Methanol

2.2.8.5 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Westernblot)

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteine mittels einer mit Blotpuffer gefüllten Transferapparatur (Bio-Rad) über Nacht bei 4°C bei konstanter Stromstärke von 100 mA auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Zur Sichtbarmachung der übertragenen Proteine und der Molekulargewichtsstandards wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S angefärbt. Danach wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 5% (m/v) Magermilchpulver in TBS blockiert. Nach dreimaligen Waschen in TBS plus 0,2% (v/v) Tween[®] 20 erfolgte die anschließende Inkubation der Membran mit dem gegen das Zielprotein gerichteten ersten Antikörper. Die Antikörper-Verdünnungen und die Inkubati-

onszeiten erfolgten gemäß den jeweiligen Herstellerangaben. Nach erfolgter Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran 4 x 5 min in TBS plus 0,2% (v/v) Tween[®] 20 gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit den entsprechenden Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörpern (Verdünnungen 1:5.000 bis zu 1:10.000) für 1 h. Die Membran wurde dann 3 x 5 min in TBS mit 0,2% (v/v) Tween[®] 20 und 1 x TBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 1 min mit dem SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte auf Kodak X-Omat Filmen nach Expositionszeiten von 5 sec bis 30 min.

Blotpuffer, pH 8,4:	20% (v/v) Methanol
	0,01% (m/v) SDS
	300 mM Glycin
	40 mM Tris

Ponceau S-Lösung:	5% (v/v) Essigsäure
	0,1% (m/v) Ponceau S

TBS, pH 7,4:	150 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl

2.2.8.6 Bestimmung der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (Vögler *et al.*, 1999)

Für diese Versuche wurden die Zellen über Nacht in Serum-depletiertem DMEM/F12 auf 60 mm Poly-L-Lysin-beschichteten Zellschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Äquilibrierung der Zellen für 10 min bei 37°C in HBSS erfolgte die Stimulation mit Carbachol in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten. Nach Stop der Reaktion durch Zugabe von 500 µl kochendem Lysis-Puffer wurde das Zellysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 95°C erhitzt und mehrmals durch eine 25-G-Kanüle gezogen. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 13) pelletiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt mittels der BCA-Methode (2.2.8.2) bestimmt. Anschließend wurden 100 µg Protein mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, mittels SDS-PAGE (2.2.8.3) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet (2.2.8.5). Die Detektion der phosphorylierten (aktivierten) MAP-Kinasen ERK1/ERK2 erfolgte mit dem anti-Phospho-p44/p42 MAP-Kinase-Antikörper (1:1000) gemäß der Herstellerangaben.

HBSS, pH 7,4:	118 mM NaCl
	15 mM HEPES

5	mM Glukose
5	mM KCl
1	mM CaCl ₂
1	mM MgCl ₂

Lysis-Puffer, pH 7,4:	1% (m/v) SDS
	10 mM Tris/HCl

2.2.8.7 Translokation intrazellulärer Proteine

(Heneweer *et al.*, 2002)

Zellen, die auf 150 mm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert worden waren, wurden zunächst ohne oder mit 100 µM Carbachol für die angegebenen Zeiten bei 37°C in HBSS inkubiert. Danach wurden die Zellen je 3 x mit 10 ml HBSS (37°C) gewaschen, in 10 ml PBS abgelöst und bei 1.700 Upm für 5 min bei RT sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer A ohne Triton X-100 aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschuß erfolgte durch dreimaliges Einfrieren für 1 min im flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C. Die zytosolische Fraktion (Überstand) wurde durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 13) gewonnen. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl Lysis-Puffer B mit Triton X-100 resuspendiert und anschließend für 2 x 10 sec sonifiziert (Braun Labsonic U). Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde erneut zentrifugiert (s.o.) und die resultierende Fraktion wurde ebenfalls aufgehoben. Nach erfolgter Proteinbestimmung (2.2.8.2) wurden identische Proteinmengen der Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.8.3) und die Proteine mittels Westernblot detektiert (2.2.8.5).

PBS, pH 7,4:	148	mM NaCl
	3,5	mM Na ₂ HPO ₄
	3	mM KCl
	1,5	mM KH ₂ PO ₄

Lysis-Puffer A, pH 7,4:	20	mM Tris/HCL
	2	mM EDTA
	2	mM EGTA
	1	mM DTT
	1	mM PMSF
	50	µg/ml Sojabohnen Trypsininhibitor
	2	µg/ml Aprotinin
	10	µM Leupeptin

Lysis-Puffer B, pH 7,4:	1%	Triton X-100 in Lysis-Puffer A
-------------------------	----	--------------------------------

2.2.8.8 Phosphorylierung von mAChRen

Hierzu wurden HEK293 tsA201-Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit 1 ml HBSS bei 37°C gewaschen und anschließend mit 1 ml 50 μCi [^{32}P]Orthophosphat (10 mCi/ml) in HBSS für 1 h bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen durch die Zugabe von 100 μM Carbachol für 5 min stimuliert. Nach Aspiration des Puffers wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem CHAPS-Solubilisierungspuffer lysiert und bei 4°C für 18 min inkubiert. Das Zellysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, homogenisiert und für 15 min bei 13.000 Upm bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13). Der Überstand mit den solubilisierten mAChRen wurde überführt und mit anti-M₂ bzw. anti-M₃ Antikörper und 50 μl Protein G-Sepharose-Beads (Pharmacia) für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler (Heidolph REAX 2) inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (4 min, 4°C bei 13.000 Upm) und der Überstand verworfen. Das Pellet mit den an Protein G-Sepharose-Beads gebundenen mAChRen wurde in 1 ml TE-Puffer plus Proteasehemmstoffen (1 mM PMSF und 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) resuspendiert und durch Zentrifugation gewaschen. Diese Prozedur wurde anschließend mit 1 ml TBS, zweimal mit je 1 ml TE-Puffer und schließlich mit 1 ml TE-Puffer wiederholt (Zentrifugation s.o.). Zur Ablösung der Rezeptoren von den Beads wurde zu dem Pellet 40 μl 2x Laemmli-Puffer und 20 μl 1 M DTT gegeben und für 2 min bei 60°C inkubiert. Die Beads wurden durch eine 4 minütige Zentrifugation bei RT und 13.000 Upm sedimentiert und die Proteine des Überstandes mittels einer 8%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proben wurde das Gel zur Identifizierung der Molekulargewichtsstandards mit Coomassie-Blau (2.2.8.4) gefärbt und auf einem Vakuum-Geltrockner (Bio-Rad Geltrockner 543) für 90 min bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie der phosphorylierten mAChRen wurde bei -80°C über Nacht mittels der Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR-Film, Kodak) durchgeführt.

CHAPS-Solubilisierungspuffer in TE-Puffer, pH 7,4:

1%	Triton X-100
1%	CHAPS
100	mM NaCl

TE-Puffer, pH 7,4:

2,5	mM Tris/HCl
2,5	mM EDTA

2.2.8.9 Immuncytochemie

HEK293-Zellen, die den M₁ oder M₂ mAChR stabil exprimierten, wurden mit den zu untersuchenden *myc-getaggt* Proteinen oder nativen Proteinen transient transfiziert. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-vorbehandelten runden Deckgläsern bis zu einer etwa 70%-

igen Konfluenz kultiviert. Die Stimulation erfolgte zu unterschiedlichen Zeiten ohne und mit 100 μ M Carbachol in 500 μ l HBSS bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgten durch eine 5 minütige Inkubation mit eiskaltem Methanol bei 4°C. Daraufhin wurde dreimal für 5 min mit PBS (RT) gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 0,5% (m/v) fettfreiem BSA in TBS für 45 min blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti-*c-myc* 9E10 monoklonaler Maus-Antikörper oder gegen das rekombinante Protein gerichtete Antikörper), der in TBS/0,5% BSA-Lösung gelöst war, erfolgte für 45 min bei RT, worauf drei Waschschritte für 5 min mit der TBS/0,5% BSA-Lösung folgten. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1 h im Dunkeln, entweder mit einem zweiten anti-Maus-IgG-Antikörper des Schafes oder mit einem zweiten anti-Ziege-IgG-Antikörper des Kaninchens, die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder mit Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC) konjugiert waren. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen dreimal für 5 min bei RT mit TBS/0,5% BSA-Lösung und letztlich mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser auf Objektträger mit Mowiol 4-88-Lösung fixiert. Die Immunfluoreszenz wurde mit einem Zeiss Axiovert-S100-Fluoreszenz-Mikroskop mit dem entsprechenden Filter für FITC bzw. TRITC detektiert. Die Hintergrund-Immunfluoreszenz der Zellen wurde mit nicht-transfizierten Methanol-fixierten Zellen oder mit Methanol-fixierten Zellen, die nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert worden waren, bestimmt. Die Hintergrundfärbung in diesen Präparaten war verglichen mit den positiven Kontrollen sehr gering.

Mowiol 4-88-Lösung, pH 8:	2,4 g Mowiol 4-88
	6 g Glycerol
	6 ml dH ₂ O
	12 ml 0,2 M Tris/HCl

2.2.9 Ligandenbindungsuntersuchungen

2.2.9.1 [³H]QNB-Bindungsassay

Die Gesamtanzahl an mAChRen wurde in Bindungsversuchen mit dem Radioliganden und mAChR-Antagonisten [³H]Quinuclidinylbenzilat ([³H]QNB; 45 Ci/mmol) bestimmt. Hierzu wurden die auf 6- bzw. 12-Loch Zellkulturplatten kultivierten HEK293 tsA201-Zellen zunächst ohne oder mit Carbachol (1 μ M - 10 mM) für 0-6 h bei 37°C in HBSS inkubiert. Nach Absaugen des Puffers wurden die Zellen mit je 2 x 2 ml pro Loch eiskaltem HBS gewaschen und je Loch in 1 ml HBS von den Platten abgekratzt. Die Zellsuspensionen von je 6 Löchern mit derselben Vorbehandlung wurden vereinigt und die Zellen durch 10-maliges Auf- und Abbewegen eines 15 ml Wheaton-Glashomogenisators homogenisiert.

Die Zahl der mAChRen wurde durch die Bindung von [^3H]QNB in einer Rezeptor-sättigenden Konzentration bestimmt. Dazu wurden 100 μl [^3H]QNB in HBS (Endkonzentration 600 pM), 100 μl HBS mit oder ohne Atropin (Endkonzentration 30 μM) und 800 μl Homogenat in ein 3,5 ml Plastikröhrchen gegeben und für 1 h bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die spezifische [^3H]QNB-Bindung ergab sich aus der Differenz der Gesamtbindung und der in Anwesenheit des mAChR-Antagonisten Atropin gemessenen Bindung. Die Bindungsreaktion wurde durch Filtration der Reaktionsansätze unter Vakuum durch Whatman GF/C-Filter beendet. Hierzu wurden die Inkubationsansätze durch die GF/C-Filter filtriert und mit je 3 x 4 ml HBS gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsröhrchen überführt und mit jeweils 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach Schütteln der Röhrchen wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

2.2.9.2 [^3H]NMS-Bindungsassay

Zur Bestimmung von mAChRen auf der Oberfläche von intakten Zellen wurde die Bindung des Radioliganden und mAChR-Antagonisten *N*-[^3H]Methylscopolamin ([^3H]NMS; 80 Ci/mmol) gemessen. Aufgrund seiner positiven Ladung ist NMS nicht in der Lage, die Plasmamembran zu passieren und an internalisierte mAChRen zu binden. Diese Eigenschaft von NMS ermöglicht es, die Internalisierung der mAChRen durch den Verlust der [^3H]NMS-Bindungsstellen an intakten Zellen zu bestimmen.

Hierzu wurden auf 24-Loch Zellkulturplatten gewachsene, konfluente Zellen zunächst bei 37°C ohne oder mit Carbachol (1 μM - 1 mM) für die angegebenen Zeiten in HBSS inkubiert. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit je 3 x 500 μl pro Loch eiskaltem HBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 2 nM [^3H]NMS in HBS für 4 h bei 4°C in Ab- und Anwesenheit von 30 μM Atropin (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung). Die Platten wurden dann 3 x mit 500 μl eiskalten HBS gewaschen und mit 500 μl 1%-igem (v/v) Triton X-100 versetzt. Nach Überführung der solubilisierten Zellen in Szintillationsröhrchen und Zugabe von je 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit erfolgte die Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler. Die Internalisierung der mAChRen wird als $(1 - \text{Quotient der } [^3\text{H}]\text{NMS-Bindung mit Carbachol behandelter und nicht mit Carbachol behandelter Zellen}) \times 100\%$ angegeben.

2.2.9.3 [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay

Um den initialen Schritt der G-Protein-Aktivierung durch mAChRen zu erfassen, wurde die Bindung des radioaktiven GTP-Analogons Guanosin-5'-O-(γ-[³⁵S]thio)triphosphat ([³⁵S]GTPγS; 1250 Ci/mmol) an membranäre G-Proteine bestimmt.

Hierzu wurden konfluente HEK293 tsA201-Zellen von drei 150 mm Kulturschalen 4 x mit 10 ml eiskaltem HBSS gewaschen, in 18 ml dieses Puffers abgekratzt, in 35 ml Sorvall SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4.000 Upm (4°C) zentrifugiert (Sorvall RC-5B). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in jeweils 5 ml HP-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) wurden die pelletierten Zellen in 20 ml Puffer B resuspendiert, in eine Spritzflasche überführt und in einer Stickstoffatmosphäre bei einem Druck von 20 bar bei 4°C für 30 min unter ständigen Rühren inkubiert. Nach Aufschluß der Zellen wurde die Suspension mit 500 µl 50 mM eiskalter EGTA-Lösung (1,25 mM Endkonzentration) vermischt und bei 4°C für 15 min bei 3.200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde über zwei Lagen Mull filtriert und bei 4°C für 15 min bei 20.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Membranpellet in 2 ml Puffer E resuspendiert, zweimal durch eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 20.000 Upm gewaschen und schließlich in 350 µl Puffer E resuspendiert. Aliquots von 50 µl der Membranfraktionen wurde in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

HP-Puffer, pH 7,4:	10	mM Triethanolamin/HCl
	140	mM NaCl
Puffer B, pH 7,5:	250	mM Saccharose
	20	mM Tris/HCl
	1,5	mM MgCl ₂
Puffer E, pH 7,5:	3	mM Benzamidin
	1	mM ATP
	1	µM Leupeptin
	100	mM PMSF
	1	mM DTT

Die Messung der Bindung von [³⁵S]GTPγS (0,3 - 0,5 nM; ca. 1 x 10⁶ cpm) an G-Proteine wurde für 20 min bei 30°C in 3,5 ml Reaktionsröhrchen durchgeführt. Die Reaktionsansätze (100 µl) enthielten [³⁵S]GTPγS, 1 µM GDP, ohne oder mit 1 mM Carbachol sowie ohne oder mit 10 µM unmarkiertes GTPγS (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung) in Puffer A. Die Inkubation wurde durch die Zugabe der Membranlösung gestartet. Die Reaktion wurde durch Vakuum-Filtration der Ansätze über Whatman GF/C-Filter beendet. Die Filter wurden mit 2 x 12 ml eiskalter Stopplösung gewaschen, in Szintillationsröhrchen überführt und

mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach Schütteln der Röhrchen wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Der Proteingehalt der Membranfraktionen wurde nach der Bradford-Methode (2.2.8.1) bestimmt. Die Ergebnisse sind in fmol induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung pro fmol mAChR dargestellt. Zur Bestimmung der Desensibilisierung der mAChRen wurden intakte Zellen vor der Membrangewinnung ohne oder mit 1 mM Carbachol für 1 min in HBSS inkubiert und anschließend dreimal mit eiskaltem HBSS gewaschen.

Puffer A, pH 7,4:	150	mM NaCl
	50	mM Triethanolamin/HCl
	5	mM MgCl_2
	1	mM EDTA
	1	mM DTT
Stopplösung, pH 7,4:	50	mM Tris/HCl
	5	mM MgCl_2

2.2.10 Bestimmung der Phospholipase C-Aktivität

Die Aktivität der Phospholipase C (PLC) wurde anhand der Bildung von Inositolphosphaten in mit *myo*-[^3H]Inositol markierten Zellen in Gegenwart von Lithium bestimmt (Berridge *et al.*, 1982). Hierzu wurden HEK293-Zellen auf 35 mm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ *myo*-[^3H]Inositol (24,4 Ci/mmol) in inositolfreiem DMEM/F12 für 24 h markiert. Nach Entfernung des radioaktiven Mediums wurden die Zellen für 10 min mit HBSS bei 37°C äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen mit Carbachol in den angegebenen Konzentration und für die angegebenen Zeiten in HBSS plus 10 mM LiCl bei 37°C inkubiert. Lithium verhindert die Dephosphorylierung von Inositolphosphaten (IP) zu Inositol und ermöglicht so die Messung der durch die PLC gebildeten Inositolphosphate ($[\text{H}]IP_x = [\text{H}]IP + [\text{H}]IP_2 + [\text{H}]IP_3$; Berridge *et al.*, 1982). Die Stimulation wurde mit der Entfernung des Mediums und der Zugabe von 500 μl eiskaltem Methanol gestoppt. Die Zellen wurden von den Platten gekratzt, mit 500 μl Methanol nachgespült und in 3,5 ml Reaktionsröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Chloroform und 500 μl dH $_2\text{O}$. Die Röhrchen wurden für 10 sec gevortext und für 10 min bei 4°C und 3.400 Upm (Heraeus Megafuge 1.0 R) zentrifugiert.

Jeweils 1 ml der oberen wässrigen Phase wurde dann auf Säulen aufgetragen, die mit 2 ml einer wässrigen 1:1 Suspension des Ionenaustauschmaterials AG 1-X8 (200-400 mesh, Formiatform; Bio-Rad) gefüllt und mit 6 ml dH $_2\text{O}$ gewaschen waren.. Durch Waschen mit

zunächst 6 ml dH₂O und anschließend 5 ml 50 mM Ammoniumformiatlösung wurden freies [³H]Inositol und [³H]Glycerophosphoinositide eluiert. Die [³H]Inositolphosphate wurden dann mit 6 ml 1 M Ammoniumformiatlösung plus 0,1 M Ameisensäure eluiert. Jeweils 1 ml des Eluats wurde mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Die Säulen wurden mit 6 ml 2 M Ammoniumformiatlösung mit 0,1 M Ameisensäure und zweimal je 6 ml dH₂O regeneriert. Die Proteingehalte wurden in parallelen, unmarkierten Ansätzen nach Bradford (2.2.8.1) bestimmt. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die Bildung von [³H]IP_x wurde in cpm x mg⁻¹ Protein angegeben.

2.2.11 Bestimmung der Phospholipase D-Aktivität

Ein Spezifikum der Phospholipase D (PLD) ist, daß sie in Gegenwart von primären Alkoholen eine Transphosphatidylierungsreaktion katalysiert, so daß z.B. in Gegenwart von Ethanol das Substrat Phosphatidylcholin statt in Phosphatidsäure (PA) in das metabolisch stabile Phosphatidylethanol (PtdEtOH) umgesetzt wird, das dann als Maß für die PLD-Aktivität genutzt werden kann.

Zur radioaktiven Markierung des Substrates wurden die Zellen zunächst für 24 h mit 2 µCi/ml [³H]Ölsäure (24,4 Ci/mmol) in DMEM/F12 inkubiert. Nach Entfernung des radioaktiven Überstandes wurden die Zellen für 10 min bei 37°C in HBSS äquilibriert und dann mit 1 mM Carbachol für die angegebenen Zeiten in Gegenwart von 400 mM Ethanol inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Methanol gestoppt. Die Zellen wurden von den Schalen abgekratzt und in ein 3,5 ml Plastikröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml Chloroform, 0,5 ml dH₂O versetzt (4°C), für 10 sec gevortext und bei 3.400 Upm für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Nach Phasentrennung wurde die untere organische Phase in einer SpeedVac-Zentrifuge (Savant SpeedVac plus SC 110A) eingedampft. Die getrockneten Lipide wurden in 25 µl Chloroform:Methanol (1:1; v/v) resuspendiert und 10 µl davon wurden auf eine Kieselgel 60 C-Platte (Merck) aufgetragen. Die Standardlipide PA und PtdEtOH zur Identifizierung der Banden wurden zusätzlich auf die Platten aufgetragen. Die Chromatographie wurde in Ethylacetat:Isooktan:Essigsäure:Wasser (13:2:3:10; v/v/v/v) als mobile Phase für 2 h entwickelt. Anschließend wurden die Phospholipide in einer Iodkammer mit Iodkristallen gefärbt und die Positionen der PA- und PtdEtOH-Fractionen mittels der Standardlipide markiert. Diese Fractionen wurden von den Platten abgekratzt, in Szintillationsröhrchen überführt und mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach Schütteln (10 sec) erfolgte die Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler. Der Proteingehalt wurde in unmarkierten Zellen nach Bradford (2.2.8.1) bestimmt. Die PLD-

Aktivität ist als Bildung von [^3H]PtdEtOH in Prozent der gesamten radioaktiven Phospholipide angegeben.

2.2.12 Bestimmung des zellulären Gehaltes an PI(4,5)P₂

(Challiss *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1989; Chilvers *et al.*, 1991)

Hierzu wurden HEK293-Zellen auf 35 mm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 10 min Äquilibration in HBSS wurden die Zellen mit 1 ml eiskalter 0,5 M TCA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zu lysieren und die wasserlöslichen Bestandteile auszuschwemmen. Der Überstand wurde abgesaugt und der Zellrasen nach der Zugabe von 940 μl Chloroform:Methanol:12 N HCl (40:80:1; v/v/v) von den Schalen gekratzt, in 6,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 310 μl Chloroform und 560 μl 0,1 N HCl vermischt. Die Phasentrennung erfolgte mittels Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0R; 10 min, 2.400 Upm bei 4°C). Vierhundert μl der in Chloroform gelösten Lipide aus der unteren Phase wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und eingedampft (Savant SpeedVac plus SC 110A). Die alkalische Hydrolyse von PI(4,5)P₂ zu IP₃ erfolgte durch Zugabe von 250 μl 1 N KOH und 15 minütiger Inkubation bei 100°C (Eppendorf Thermoblock). Zur Neutralisation wurden die Proben auf eine Ionentauschersäule (Bio-Rad AG, W50-X8 200-400 mesh, Hydrogenform) aufgetragen und fünfmal mit je 250 μl dH₂O eluiert. Die Eluate wurden mit 200 μl NaHCO₃ auf einen pH-Wert von 6 - 7 eingestellt und anschließend mit 2 ml 1-Butanol:Petrolbenzin (5:1; v/v) gewaschen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2.400 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) wurde 1 ml der unteren wässrigen Phase zur Bestimmung von IP₃ entnommen. Die Säulen wurden mit 5 ml 1 N HCl und je fünfmal mit je 5 ml dH₂O regeneriert.

Der IP₃-Gehalt der Proben wurde in einem [^3H]IP₃-Kompetitionsassay mit einem IP₃-Bindungsprotein bestimmt. Dazu wurden 30 μl eines IP₃-Bindungsproteins, das an unserem Institut aus Rindernebenennieren präpariert wurde, zusammen mit 30 μl 0,036 bis 36 pmol [^3H]IP₃ (spez. Radioaktivität: 21 Ci/mmol), 30 μl Probe und 30 μl Assaypuffer für 30 min bei 4°C in 3,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 ml eiskalten Waschpuffer abgestoppt (s.u.). Zur Trennung von freien und gebundenen IP₃ wurden die Proben über Whatman GF/C-Filter filtriert. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Nach Schütteln wurde die Radioaktivität mittels Szintillationszählung bestimmt. Die Quantifizierung des IP₃-Gehaltes in den Proben erfolgte durch Vergleich mit einer parallel hergestellten Standardkurve. Der zelluläre PI(4,5)P₂-Gehalt wurde in pmol PI(4,5)P₂ x mg⁻¹ Protein angegeben.

Homogenisierungspuffer, pH 8,0:	20	mM NaHCO ₃
	1	mM DTT
Assaypuffer, pH 8,0:	100	mM Tris/HCl
	4	mM EDTA
Waschpuffer, pH 8,0:	25	mM Tris/HCl
	1	mM EDTA
	5	mM NaHCO ₃

2.2.13 Bestimmung der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration

Die Bestimmung der intrazellulären freien Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) erfolgte mit dem fluoreszierenden Ca²⁺-Indikator Fura-2. Hierzu wurden die Zellen von 150 mm Zellkulturschalen abgelöst und 5 min bei 1.700 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) bei RT zentrifugiert. Das Pellet (ca. 5 x 10⁵ Zellen/ml) wurde in 10 ml HBSS plus 10 mg/ml D-Glukose und 10 mg/ml BSA resuspendiert und für 1 h im Dunkeln bei 37°C mit dem membrangängigen Fura-2/AM (1 µM) beladen. Die Zellen wurden dann bei 1.700 Upm (Heraeus Megafuge 1.0R) für 5 min pelletiert, in HBSS/Glukose/BSA resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 20 ml HBSS/Glukose/BSA aufgenommen. Je 2 ml davon wurden in Messküvetten überführt. Die Bestimmung der maximalen [Ca²⁺]_i-Erhöhung nach Zugabe von 100 nM bzw. 1 mM Carbachol erfolgte innerhalb der nächsten Stunde in einem Hitachi F2000 Spektrofluorimeter. Es wurden alle 500 msec mit wechselnden Exzitationswellenlängen (340 nm und 380 nm) gemessen. Die maximale Fluoreszenz wurde nach Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin (1 %) bestimmt. Nach der anschließenden Behandlung der Zellen mit 5 mM EGTA wurde das Emissionsminimum ermittelt. [Ca²⁺]_i wurde anschließend mit der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software errechnet.

2.2.14 Datenauswertung

Die Graphiken wurden mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPadPrism (Version 3.02, 2000) erstellt. Alle Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben, in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen von der angegebenen Anzahl an unabhängigen Versuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Rolle der GRK2 und CK1 α bei der Internalisierung und Desensibilisierung von mAChRen

Die Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRen), einschließlich der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRen), ist eng verknüpft mit der Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren. Es ist bekannt, daß mAChRen nach Agonist-Stimulation einerseits durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKen) wie die GRK2 (Pitcher *et al.*, 1998) und andererseits auch durch die kürzlich identifizierte Caseinkinase 1 α (CK1 α ; Tobin *et al.*, 1997) phosphoryliert werden können. Dabei werden die Rezeptoren überwiegend an Serin- und Threonin-Resten in der dritten zytoplasmatischen Schleife phosphoryliert (van Koppen und Kaiser, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst systematisch der Einfluß der GRK2 und der CK1 α auf die Internalisierung und Desensibilisierung der mAChR-Subtypen M₁, M₂, M₃ und M₄ in HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen untersucht.

3.1.1 Expression von GRK2, CK1 α und ihren dominant-negativen Mutanten in HEK293 tsA201-Zellen

Für diese Untersuchungen standen die plasmidkodierte cDNAs von Wildtyp GRK2 und CK1 α , den katalytisch inaktiven, dominant-negativen Mutanten GRK2 K220W und CK1 α K46R sowie eines 118 Aminosäuren umfassenden Peptids (I3M₃) der dritten zytoplasmatischen Schleife des M₃ mAChRs (345-463), welches als Pseudosubstrat für die CK1 α fungiert, zur Verfügung. Mittels Westernblots mit spezifischen Antikörpern wurde zunächst die (Über)Expression der jeweiligen Proteine in HEK293 tsA201-Zellen bestimmt, die transient mit plasmidkodierter cDNA von GRK2, GRK2 K220W, CK1 α , CK1 α K46R und I3M₃ bzw. den leeren Vektoren transfiziert waren.

Wie aus Abb. 3.1 ersichtlich ist, erfolgte eine sehr starke Überexpression bzw. Expression von Wildtyp GRK2 und seiner Mutante GRK2 K220W bezogen auf die endogene Expression dieses Proteins mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 79 kDa in den transfizierten HEK293 tsA201-Zellen. Des weiteren wurden auch Wildtyp CK1 α und CK1 α K46R mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 38 kDa in den Zellen deutlich überexprimiert. Auch das I3M₃-Peptid mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 12,5 kDa konnte in den transfizierten HEK293 tsA201-Zellen deutlich detektiert werden.

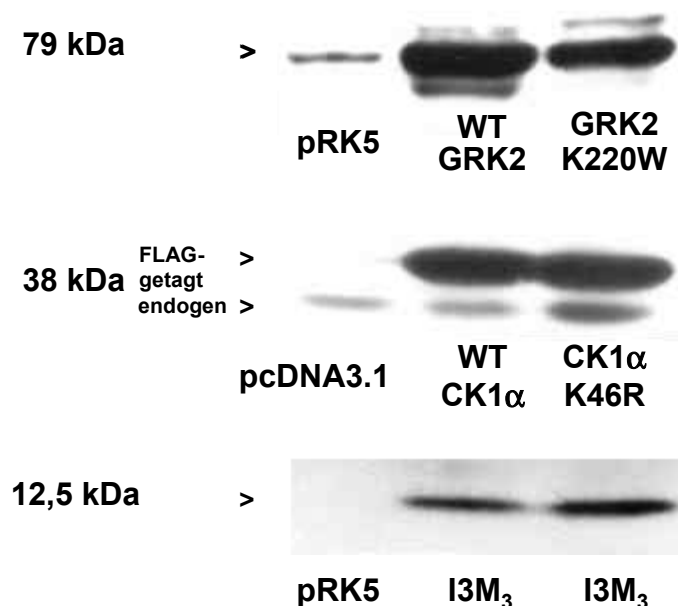


Abb. 3.1: Expression von GRK2, CK1 α , ihrer dominant-negativen Mutanten GRK2 K220W und CK1 α K46R sowie von I3M₃, eines Fragmentes der dritten zytoplasmatischen Schleife des M₃ mAChRs, in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden auf 150 mm Schalen kultiviert und transient mit je 150 μ g cDNA kodierend für Wildtyp (WT) GRK2, GRK2 K229W, WT CK1 α , CK1 α K46R und I3M₃ bzw. die leeren Vektoren pRK5 und pcDNA3.1 transfiziert. Gleiche Mengen an Zellysat (100 μ g Protein/Spur) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Detektion von WT GRK2 und GRK2 K220W erfolgte mit einem anti-GRK2-Antikörper, die von WT CK1 α und CK1 α K46R mit einem anti-CK1 α -Antikörper und die von I3M₃ mit einem anti-I3M₃-Antikörper. Dargestellt sind Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

3.1.2 Einfluß der GRK2 und CK1 α auf die Desensibilisierung und Internalisierung von M₂ und M₄ mAChRen

Hinsichtlich der Rolle der GRK2 bei der Phosphorylierung und Internalisierung von M₂ mAChRen wurden in den vergangenen Jahren teilweise unterschiedliche Ergebnisse publiziert. So wurde gezeigt, daß durch Überexpression der GRK2 in COS-7-Zellen sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung von M₂ mAChRen gesteigert wird, während die Expression der dominant-negativen Mutante GRK2 K220W die Phosphorylierung und die Internalisierung des M₂ mAChRs blockierte (Tsuga *et al.*, 1994). Dagegen hatte die Expression der GRK2 K220W in HEK293-Zellen keinen Effekt auf die Internalisierung, nur die Agonist-induzierte Phosphorylierung der M₂ mAChRen wurde um ca. 50% gehemmt (Pals-Rylaarsdam *et al.*, 1995).

Zunächst wurde deshalb der Einfluß von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W und der CK1 α -Mutante CK1 α K46R auf die Desensibilisierung des M₂ mAChRs untersucht. Hierzu wurden HEK293 tsA201-Zellen transient mit dem M₂ mAChR zusammen mit GRK2, GRK2 K220W oder CK1 α K46R bzw. leeren Vektoren transfiziert und für 1 min bei 37°C ohne und mit dem mAChR-Agonist Carbachol (1 mM) inkubiert. Anschließend wurde in Membranen dieser Zellen die durch Carbachol induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung an G-Proteine als Maß der M₂ mAChR-Aktivität bzw. -Desensibilisierung bestimmt. Wie in Abb. 3.2 gezeigt, führte die Vorbehandlung von Kontrollzellen mit Carbachol zu einer ca. 50%-igen Reduktion der durch den M₂ mAChR induzierten [³⁵S]GTP γ S-Bindung. Die Überexpression von Wildtyp GRK2 führte zu einer leichten Verstärkung der Desensibilisierung. Dagegen wurde durch die Expression der GRK2 K220W-Mutante die Desensibilisierung des M₂ mAChRs vollständig unterdrückt. Die Expression der CK1 α K46R-Mutante hatte keinerlei Auswirkung auf die durch den M₂ mAChR induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung. Dieses Ergebnis zeigte, daß die Desensibilisierung des M₂ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen durch die GRK2 vermittelt wird und unabhängig von der CK1 α ist.

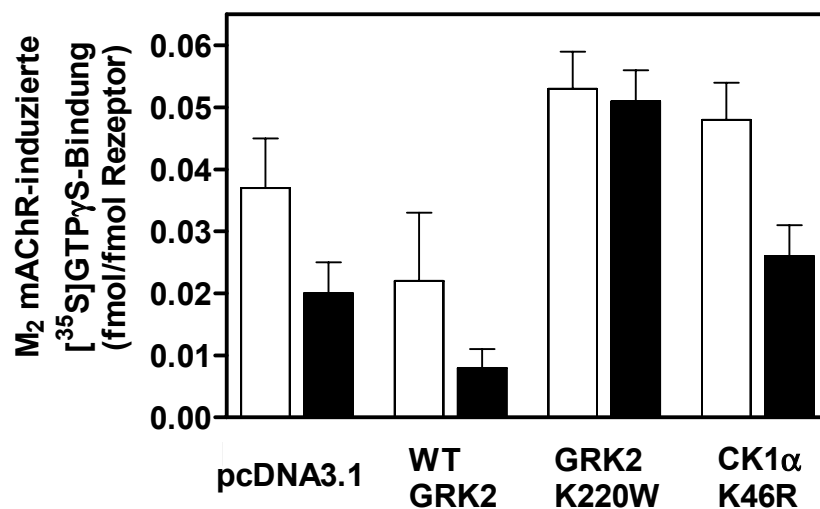


Abb. 3.2: Einfluß von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W und CK1 α K46R auf die Desensibilisierung des M₂ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden transient mit 25 μ g M₂ mAChR cDNA in pCD-PS zusammen mit 150 μ g leerem pcDNA3.1-Vektor, vektorkodierter cDNA GRK2 in pEF/BOS, GRK2 K220W in pEF/BOS oder CK1 α K46R in pcDNA3.1 kotransfiziert und für 1 min bei 37°C ohne (weiße Balken) und mit 1 mM Carbachol (schwarze Balken) inkubiert. Anschließend wurden in Membranen dieser Zellen die durch 1 mM Carbachol induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung und die M₂ mAChR-Zahl bestimmt. Die Vorbehandlung mit Carbachol hatte keinen Einfluß auf die M₂ mAChR-Zahl (nicht gezeigt). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4-7 unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde der Einfluß von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W, Wildtyp CK1 α , CK1 α K46R und I3M₃ auf die Internalisierung des M₂ mAChRs und des verwandten M₄ mAChRs untersucht. Dazu wurden HEK293 tsA201-Zellen transient mit dem M₂ bzw. M₄ mAChR sowie den genannten Proteinen transfiziert und anschließend ohne und mit 10 μ M Carbachol für verschiedene Zeiten inkubiert. Die Zahl der verbliebenen Oberflächenrezeptoren wurde mittels Bindung des membranimpermeablen Liganden [³H]NMS bestimmt. Wie aus Abb. 3.3A hervorgeht, wurden in den Kontrollzellen nach 5 min Stimulation mit Carbachol ca. 10%, nach 15 min ca. 45% und nach 60 min ca. 65% der M₂ mAChRen internalisiert. Durch Koexpression von Wildtyp GRK2 wurde die Geschwindigkeit, aber nicht das maximale Ausmaß der Internalisierung von M₂ mAChRen gesteigert. So internalisierten nach 5 min 40% und nach 60 min 60% der M₂ mAChRen. Durch die Expression von GRK2 K220W wurde sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung signifikant gehemmt. Nach 5 und 60 minütiger Stimulation wurden lediglich $1 \pm 3\%$ und $42 \pm 6\%$ der M₂ mAChRen internalisiert. Die Expression von CK1 α K46R, Wildtyp CK1 α oder I3M₃, des Pseudosubstrates der CK1 α (nicht gezeigt), hatte keinen Einfluß auf die Internalisierung von M₂ mAChRen. Wie in Abb. 3.3B gezeigt, wurden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von GRK2, GRK2 K220W und CK1 α auf die Internalisierung des M₄ mAChRs erzielt.

Es ist bekannt, daß für die Phosphorylierung von GPCRen die zytosolische GRK2 zunächst an membranständige freie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden muß (Ferguson, 2001). Es wurde deshalb untersucht, ob durch die Expression des G $\beta\gamma$ -bindenden C-terminalen Peptids der GRK2 (β ARKct) oder der G α -Untereinheit von Transducin die Internalisierung des M₂ mAChRs gehemmt wird. Diese Peptide sollten die Translokation der GRK2 an die Membran und damit die Rezeptor-Phosphorylierung verhindern. Wie in Abb. 3.4 gezeigt, wurde durch die Expression von β ARKct und G α -Transducin sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung von M₂ mAChRen drastisch reduziert, sogar noch stärker als nach Expression von GRK2 K220W.

Zusammenfassend kann also hier festgestellt werden, daß die GRK2 offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Desensibilisierung und Internalisierung des M₂ mAChRs und des verwandten M₄ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen spielt. Um diese Wirkungen zu erzielen, benötigt die GRK2 freie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Dagegen hat die CK1 α anscheinend keine Bedeutung für die Internalisierung von M₂ und M₄ mAChRen.

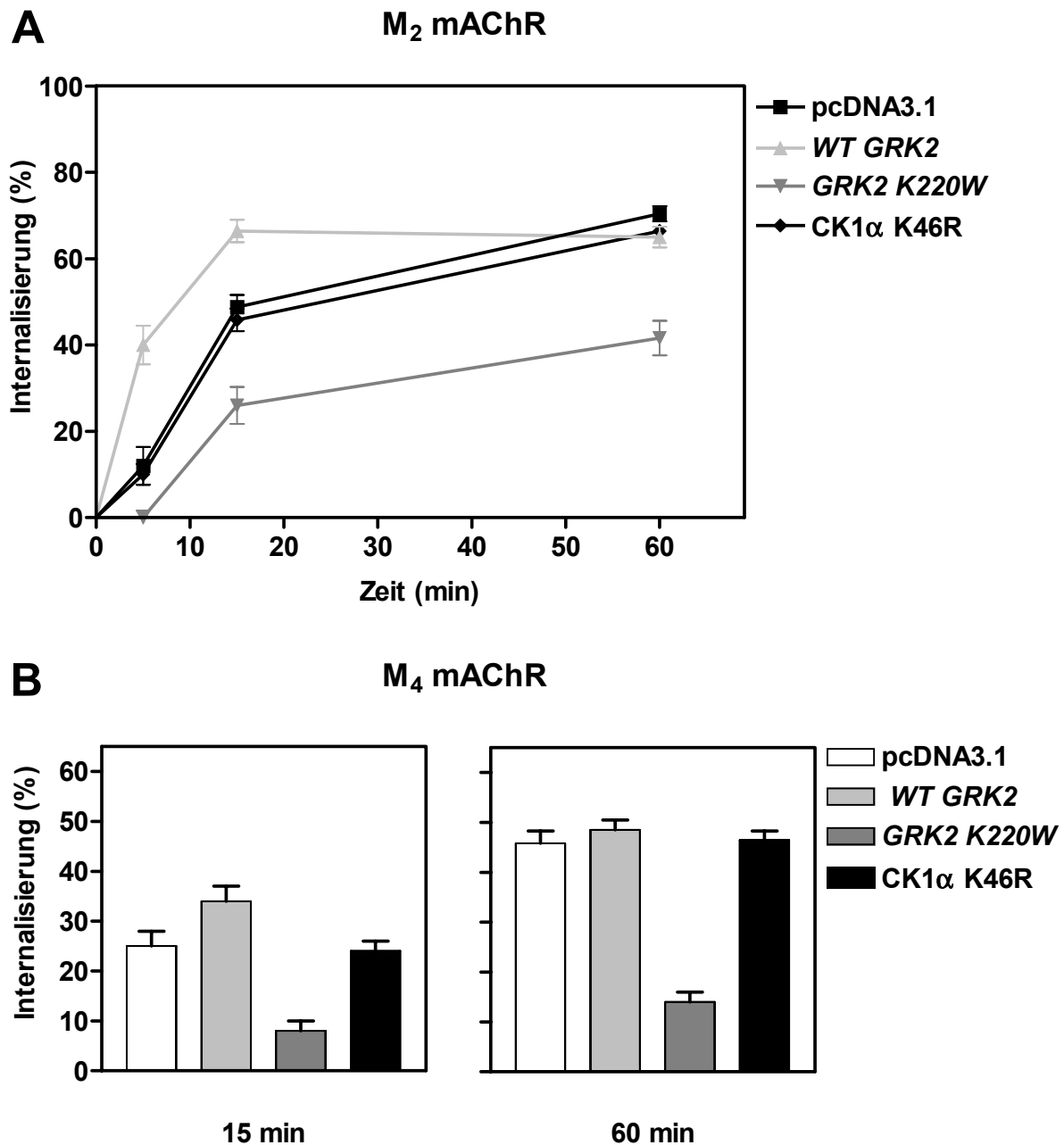


Abb. 3.3: Einfluß von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W und CK1α K46R auf die Internalisierung von M₂ (A) und M₄ (B) mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit dem M₂ bzw. M₄ mAChR sowie mit leerem pcDNA3.1, Wildtyp (WT) GRK2, GRK2 K220W oder CK1α K46R transient transfiziert und anschließend ohne und mit 10 µM Carbachol für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Die Internalisierung der Rezeptoren wurde mittels [³H]NMS-Bindung an Zelloberflächenrezeptoren an intakten Zellen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 8-11 unabhängigen Experimenten.

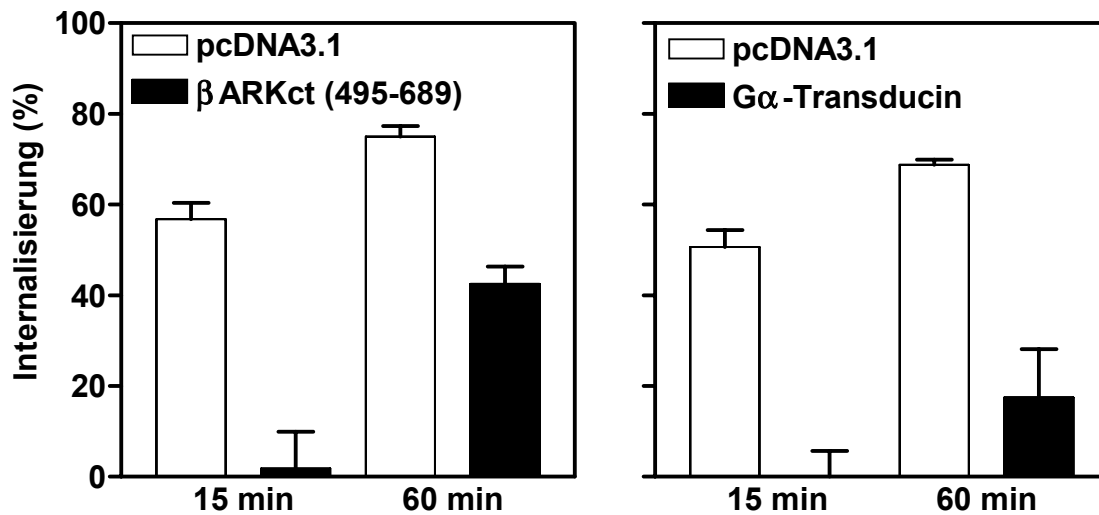


Abb. 3.4: Einfluß von β ARKct und G α -Transducin auf die Internalisierung des M₂ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 μ g M₂ mAChR in pCD-PS zusammen mit je 150 μ g leerem pcDNA3.1-Vektor, β ARKct in pRK5 oder G α -Transducin in pCis transfiziert und anschließend für 15 bzw. 60 min ohne und mit 10 μ M Carbachol inkubiert. Die Internalisierung der Rezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 5-7 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Einfluß der GRK2 und CK1 α auf die Internalisierung und Desensibilisierung von M₁ und M₃ mAChRen

Im Folgenden wurde dann untersucht, ob die GRK2 und CK1 α eine Rolle bei der Internalisierung und Desensibilisierung der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRen spielen. Zunächst wurde eine mögliche Beteiligung bei der Internalisierung dieser Rezeptoren untersucht. Das Vorgehen und die Analyse der Daten erfolgten in ähnlicher Weise wie oben für die M₂ und M₄ mAChRen dargestellt. Die Expression von Wildtyp CK1 α und I3M₃ (nicht gezeigt) hatte keinen Einfluß auf die durch Carbachol (1 mM) induzierte Internalisierung von M₁ mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen, während durch die Expression von CK1 α K46R die Geschwindigkeit (in den ersten 15 min), aber nicht das maximale Ausmaß der Internalisierung gehemmt wurde (Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu wurde durch die Expression von sowohl Wildtyp GRK2 als auch GRK2 K220W eine signifikante Steigerung der Internalisierungsgeschwindigkeit des M₁ mAChRs erzielt.

Hinsichtlich der Internalisierung des M₃ mAChRs hatten GRK2 und CK1 α andere Effekte. Die Expression von GRK2 K220W, Wildtyp CK1 α und CK1 α K46R hatte keinen Einfluß auf die Internalisierungsgeschwindigkeit des Rezeptors, während das maximale Ausmaß nach 60 minütiger Inkubation mit Carbachol durch GRK2 K220W und Wildtyp

CK1 α herabgesetzt wurde (Abb. 3.5). Die Überexpression von Wildtyp GRK2 steigerte sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Internalisierung des M₃ mAChRs.

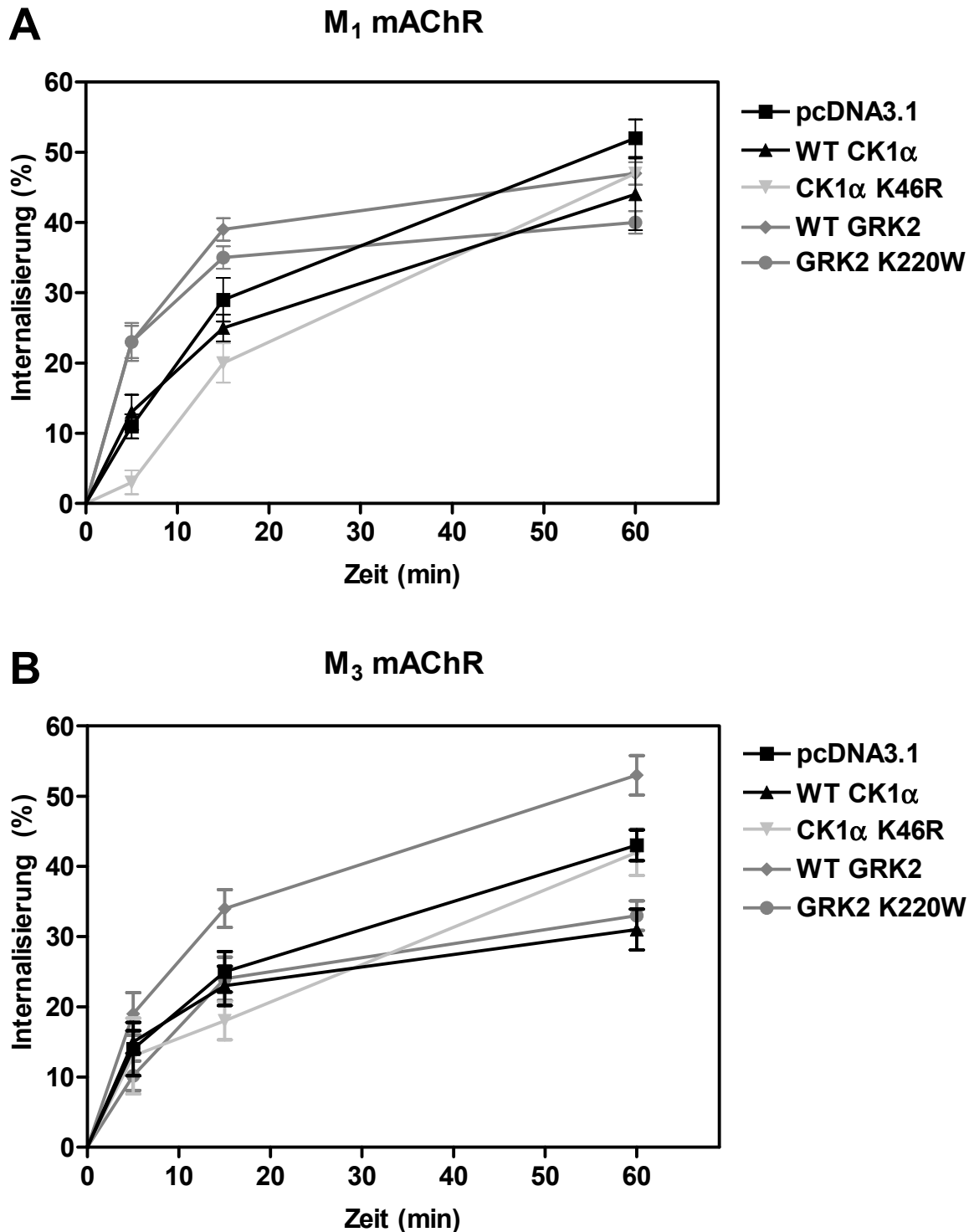


Abb. 3.5: Einfluß von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W, Wildtyp CK1 α und CK1 α K46R auf die Internalisierung von M₁ (A) und M₃ (B) mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit dem M₁ bzw. M₃ mAChR und entweder mit leerem pcDNA3.1, Wildtyp (WT) GRK2, GRK2 K220W, WT CK1 α oder CK1 α K46R transfiziert und anschließend ohne und mit 1 mM Carbachol für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Internalisierung der Rezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 8-14 unabhängigen Experimenten.

Um zu prüfen, ob wie von anderen Autoren für HEK293-Zellen beschrieben (Tobin *et al.*, 1997; Budd *et al.*, 2000), die CK1 α auch bei der Phosphorylierung des M₃ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen beteiligt ist, wurde die Phosphorylierung des Rezeptors in mit [³²P]Orthophosphat markierten Zellen, die den M₃ mAChR ohne oder mit der CK1 α K46R exprimierten, bestimmt. Wie aus Abb. 3.6 hervorgeht, führte eine Stimulation der Zellen für 5 min mit 100 μ M Carbachol zu einer deutlichen [³²P]Phosphorylierung des M₃ mAChRs. Diese Phosphorylierung wurde durch die Expression der dominant-negativen CK1 α -Mutante gehemmt. Damit konnte das Ergebnis der CK1 α -abhängigen Phosphorylierung des M₃ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen bestätigt werden.

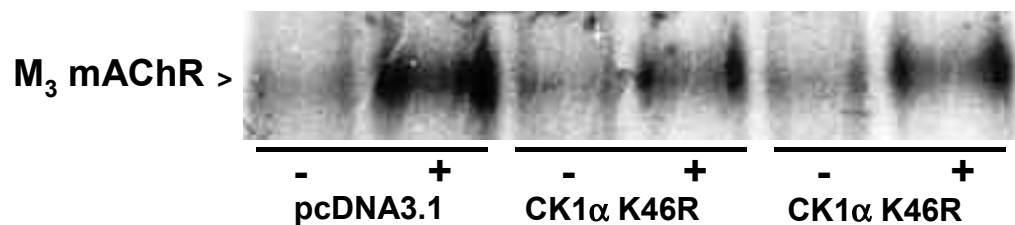


Abb. 3.6: **Einfluß von CK1 α K46R auf die Phosphorylierung des M₃ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.**

HEK293 tsA201-Zellen wurden mittels FuGene6 Transfektionsreagenz mit 1 μ g M₃ mAChR in pCD-PS zusammen mit je 1 μ g leerem pcDNA3.1-Vektor oder CK1 α K46R transfiziert, dann für 1 h mit [³²P]Orthophosphat beladen und schließlich für 5 min ohne (-) oder mit (+) 100 μ M Carbachol bei 37°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen, Präzipitation mit einem spezifischen anti-m3-Antikörper und SDS-PAGE wurden die radioaktiv markierten Proteine mit einem Röntgenfilm detektiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 4 unabhängigen Experimenten.

Da nicht bekannt war, ob und in welcher Weise GRK2 und CK1 α bei der Desensibilisierung von M₁ und M₃ mAChRen beteiligt sind, wurde zunächst der Einfluß dieser Protein-kinasen und ihrer dominant-negativen Mutanten auf die Stimulation der Phospholipase D (PLD) durch diese Rezeptoren untersucht. Es ist bekannt, daß die über M₁ und M₃ mAChRen vermittelte Stimulation der PLD in HEK293-Zellen innerhalb weniger Minuten vollständig desensibilisiert (Schmidt *et al.*, 1995). Um zu prüfen, ob GRK2 und/oder CK1 α bei dieser Desensibilisierung beteiligt sind, wurden HEK293-Zellen, die stabil den M₁ oder M₃ mAChR exprimierten, transient mit Wildtyp GRK2, GRK2 K220W, Wildtyp CK1 α oder CK1 α K46R transfiziert. Anschließend wurde die durch 1 mM Carbachol induzierte Bildung von PtdEtOH

als Maß für die PLD-Aktivität bestimmt. Wie in Abb. 3.7 gezeigt, war die durch Carbachol induzierte Bildung von PtdEtOH in Kontrollzellen innerhalb von maximal 5 min vollständig abgeschlossen, unabhängig davon, ob sie über den M₁ oder den M₃ mAChR induziert war. Wie exemplarisch für die Expression von CK1 α K46R gezeigt, wurde der Zeitverlauf der PLD-Aktivierung durch die beiden mAChRen durch die Expression der dominant-negativen CK1 α -Mutante in keiner Weise verändert. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Expression von Wildtyp GRK2, GRK2 K220W und Wildtyp CK1 α erzielt (nicht gezeigt).

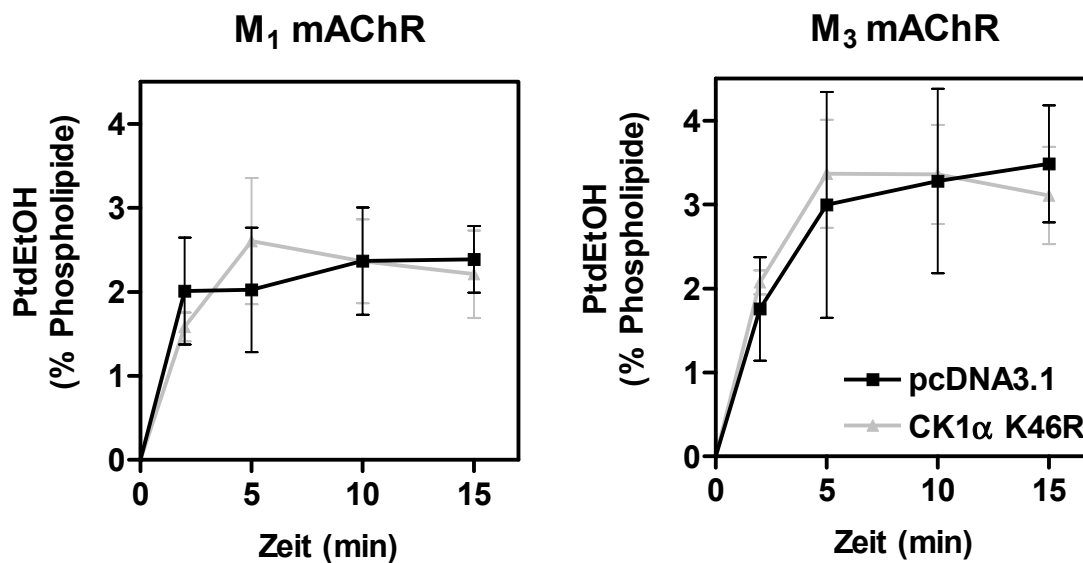


Abb. 3.7: Einfluß der dominant-negativen CK1 α K46R-Mutante auf die über den M₁ und M₃ mAChR vermittelte Stimulation der PLD.

HEK293-Zellen, die stabil den M₁ oder M₃ mAChR exprimierten, wurden mit je 150 μ g leerer pcDNA3.1 oder CK1 α K46R transient transfiziert und für 24 h mit [3 H]Ölsäure markiert. Anschließend wurde die durch 1 mM Carbachol induzierte Bildung von [3 H]PtdEtOH in Gegenwart von Ethanol für die angegebenen Zeiten bei 37°C bestimmt. Die Bildung von [3 H]PtdEtOH ist als % der gesamten markierten Phospholipide angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Die M₁ und M₃ mAChRen koppeln über G_q-Proteine an die Phospholipase C (PLC), was zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) führt, das dann Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzt (Bonner *et al.*, 1987, 1988; Caulfield, 1993). Es wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob die CK1 α evtl. einen Einfluß auf den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) durch diese beiden mAChR-Subtypen hat. Dazu wurden HEK293-Zellen, die stabil den M₁ oder M₃ mAChR exprimierten, transient mit Wildtyp CK1 α oder CK1 α K46R transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM oder 1 mM Carbachol

stimuliert. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Zellen wurde mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fura-2 bestimmt. Wie aus der Tab. 3.1 zu entnehmen ist, führte die Stimulation des M_1 und M_3 mAChRs mit Carbachol zu deutlichen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen. Diese $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, ob induziert durch 100 nM oder 1 mM Carbachol, wurden weder durch die Überexpression der Wildtyp CK1 α , noch durch Expression der dominant-negativen Mutante CK1 α K46R signifikant verändert. In Übereinstimmung mit diesen Daten fanden sich auch keine signifikanten Einflüsse von CK1 α oder CK1 α K46R, wenn statt der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung die Stimulation der PLC über M_1 und M_3 mAChRen untersucht wurde (nicht gezeigt).

Tab. 3.1: Einfluß von CK1 α und CK1 α K46R auf die durch den M_1 und M_3 mAChR induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen, die den M_1 oder M_3 mAChR stabil exprimierten, wurden mit 150 μ g cDNA kodierend für den pcDNA3.1 Vektor, Wildtyp (WT) CK1 α oder CK1 α K46R transient transfiziert. Anschließend wurde in diesen Zellen die durch 100 nM oder 1 mM Carbachol induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der durch Carbachol maximal induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

mAChR-Subtyp	Carbachol-Konzentration	pcDNA3.1	WT CK1 α	CK1 α K46R
		$[Ca^{2+}]_i$ (nM)		
M_1 mAChR	100 nM	141 \pm 29	111 \pm 37	129 \pm 37
	1 mM	680 \pm 197	785 \pm 176	899 \pm 123
M_3 mAChR	100 nM	341 \pm 13	340 \pm 20	358 \pm 52
	1 mM	563 \pm 70	571 \pm 87	604 \pm 78

Budd und Mitarbeiter zeigten kürzlich, daß die über den M_3 mAChR induzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) ERK1 und ERK2 in CHO-Zellen durch Expression der dominant-negativen CK1 α K46R-Mutante gehemmt wird (Budd *et al.*, 2001). Es wurde deshalb schließlich untersucht, ob die CK1 α einen ähnlichen Effekt auf die M_1 bzw. M_3 mAChR-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 in HEK293-Zellen ausübt. Dazu wurden HEK293-Zellen, die den M_1 oder M_3 mAChR stabil exprimierten, transient mit Wildtyp CK1 α oder CK1 α K46R transfiziert. Die Zellen wurden dann ohne und mit 10 μ M Carbachol für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung von ERK1/2 wurde in Lysaten dieser Zellen anhand ihrer Phosphorylierung mit einem spezifischen anti-phospho-ERK1/2-Antikörper detektiert. Abb. 3.8 zeigt, daß Stimulation des M_1 oder M_3 mAChRs mit Carbachol in Kontrollzellen zu einer deutlichen Phosphorylierung, d.h. Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 führt. Diese Aktivierung wurde weder durch Expression von CK1 α

K46R signifikant vermindert, noch durch Expression von Wildtyp CK1 α signifikant gesteigert. Ähnliche Befunde wurden auch nach 30 minütiger Stimulation der Zellen mit Carbachol erhoben (nicht gezeigt).

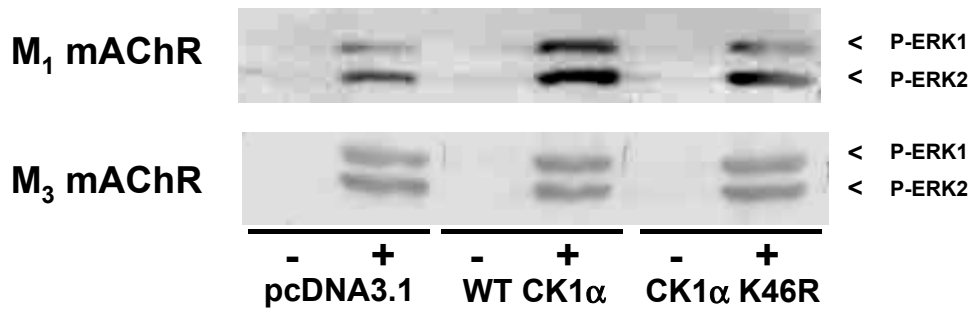


Abb. 3.8: Einfluß von CK1 α und CK1 α K46R auf die M₁ und M₃ mAChR-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 in HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen, die stabil den M₁ oder M₃ mAChR exprimierten, wurden mit je 150 μ g vektorkodierter leerer pcDNA3.1, Wildtyp (WT) CK1 α oder CK1 α K46R transient transfiziert, dann über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und schließlich für 5 min ohne (-) und mit (+) 10 μ M Carbachol bei 37°C inkubiert. Nach Lyse der Zellen und SDS-PAGE wurden die phosphorylierten (P) ERK1- und ERK2-Proteine mittels Western-blot mit einem anti-phospho-ERK1/2-Antikörper detektiert. Dargestellt sind Ergebnisse von repräsentativen Experimenten.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, daß die GRK2 und CK1 α zwar gewisse Effekte auf die Internalisierung von M₁ und M₃ mAChRen ausüben können und daß die CK1 α anscheinend bei der Agonist-induzierten Phosphorylierung des M₃ mAChRs beteiligt ist. Dagegen konnten mittels verschiedener funktioneller Assays (Stimulation von PLD und PLC, [Ca²⁺]_i-Erhöhung, Aktivierung von ERK1/2) keinerlei Hinweise dafür erbracht werden, daß diese Kinasen bei der Signaltransduktion über M₁ und M₃ mAChRen und ihrer Abschaltung in HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen beteiligt sind.

3.2 Rolle von Intersectin bei der Internalisierung von mAChRen

Intersectin gehört zu der immer größer werdenden Zahl von Proteinen, von denen in den letzten Jahren gezeigt wurde, daß sie an der Internalisierung von plasmamembranständi-

gen Rezeptoren beteiligt sind. Immunfluoreszenz-Untersuchungen hatten gezeigt, daß Intersectin sowohl im Zytoplasma als auch in kleinen Spots an der Plasmamembran mit Clathrin assoziiert vorliegt (Hussain *et al.*, 1999). Durch die Überexpression des murinen Intersectins (Ese1) in kultivierten COS1-Zellen wurde die durch Clathrin vermittelte Endozytose des Transferrin-Rezeptors blockiert (Sengar *et al.*, 1999).

Für uns war es deshalb von Interesse, ob Intersectin auch bei der Clathrin-unabhängigen Internalisierung des M₂ mAChRs und der Clathrin-abhängigen Internalisierung des M₁ mAChRs beteiligt ist. Dazu wurde der Effekt der kurzen Isoform von Intersectin und der fünf isolierten SH3-Domänen (SH3A bis SH3E) aus *Xenopus laevis* bei der Internalisierung der genannten mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen untersucht.

3.2.1 Einfluß von Intersectin auf die Internalisierung des M₂ mAChRs

Zunächst wurde der Effekt der kurzen Isoform von Intersectin auf die Internalisierung des M₂ mAChRs untersucht. Dazu wurden HEK293 tsA201-Zellen mit dem M₂ mAChR und steigenden Mengen an Intersectin transfiziert und anschließend für 5 bzw. 15 min mit 10 µM Carbachol inkubiert. Wie in Abb. 3.9 dargestellt, führte die Expression von Intersectin zu einer deutlichen dosisabhängigen Reduktion der durch Carbachol induzierten Internalisierung des M₂ mAChRs.

Daraufhin wurde geprüft, ob die Aktivierung des M₂ mAChRs zu einer subzellulären Umverteilung von Intersectin führt. Dazu wurden HEK293 tsA201-Zellen mit dem M₂ mAChR und FLAG-getagtem Intersectin kotransfiziert und dann für 5 bzw. 30 min mit 10 µM Carbachol stimuliert. Die Detektion von Intersectin erfolgte mit einem anti-FLAG-Antikörper und dem sekundären anti-Maus FITC-Antikörperkonjugat. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, daß Intersectin unabhängig von der Stimulation mit Carbachol sowohl im Zytoplasma als auch an der Membran vorliegt (Abb. 3.10). Intersectin war auch an zirkulären Zellstrukturen lokalisiert, was auf eine Interaktion mit anderen Proteinen hindeutet.

Es kann also hier festgehalten werden, daß die Clathrin-unabhängige Internalisierung des M₂ mAChRs durch die Expression von Intersectin gehemmt werden kann und daß die subzelluläre Verteilung von Intersectin durch Aktivierung des Rezeptors nicht geändert wird.

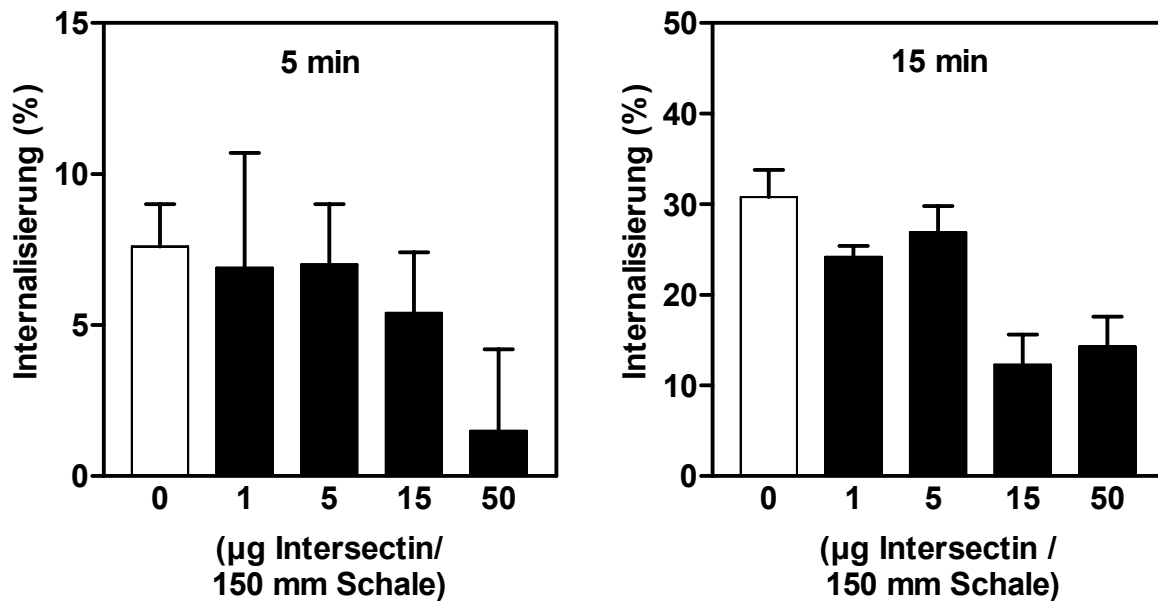


Abb. 3.9: Einfluß von Intersectin auf die Internalisierung des M₂ mAChRs.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 12,5 µg M₂ mAChR DNA in pCD-PS zusammen mit leerem pcDNA3.1-Vektor (weißer Balken) oder 1-50 µg Intersectin in pRK5 (schwarze Balken) pro 150 mm Zellkulturschale transfiziert, wobei die Gesamtmenge an DNA konstant gehalten wurde. Anschließend wurden die Zellen für 5 bzw. 15 min mit 10 µM Carbachol stimuliert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

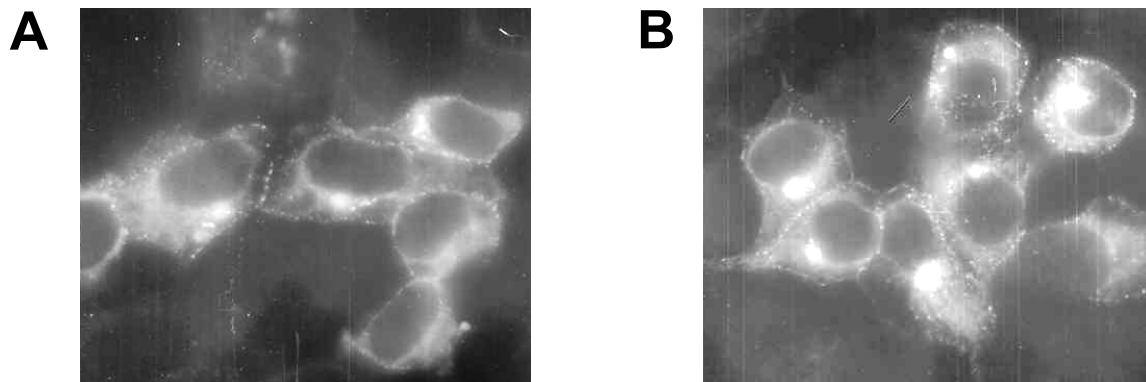


Abb. 3.10: Subzelluläre Lokalisation von Intersectin in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 12,5 µg M₂ mAChR DNA in pCD-PS zusammen mit 5 µg FLAG-getaggtm Intersectin transfiziert und dann ohne (A) oder mit (B) 10 µM Carbachol für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde Intersectin mit einem anti-FLAG-Antikörper und dem sekundären anti-IgG/FITC-Antikörperkonjugat der Maus identifiziert.

In Anlehnung an die Arbeit von Yamabhai *et al.* (1998) wurde dann der Frage nachgegangen, welchen Einfluß die isolierten SH3-Domänen (SH3A-E) von Intersectin auf die Internalisierung von mAChRen haben, zumal gezeigt worden war, daß die Endozytose des Transferrin-Rezeptors durch die Expression der isolierten Intersectin SH3A-Domäne gehemmt wird (Simpson *et al.*, 1999). Zu diesem Zweck wurde zunächst die heterologe Expression von Intersectin SH3A-E in HEK293 tsA201-Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. Dazu wurde der M₂ mAChR mit den c-myc-getaggten SH3A-E-Domänen von Intersectin oder der c-myc-getaggten N-terminalen SH3-Domäne von Grb2 (Grb2 NSH3) transfiziert. Grb2 NSH3 wurde für alle nachfolgenden Versuche als SH3-spezifische Kontrolle verwendet, da Expression dieses Peptids keinen Einfluß auf die Expression oder die Internalisierung von mAChRen hatte (nicht gezeigt). Die Expression der SH3-Domänen wurde mit einem anti-c-myc-Antikörper und dem sekundären anti-Maus FITC-Antikörperkonjugat detektiert. Wie Abb. 3.11 zeigt, wurden alle SH3-Domänen exprimiert. Die Expression der Intersectin SH3A-E-Domänen führte zu einer Reduktion der Zellzahl sowie zu einer Verminderung der Gesamtzahl an detektierten M₂ und M₁ mAChRen (Tab. 3.2), was auf eine Hemmung des Zellwachstums hindeutet.

Tab. 3.2: Einfluß von Intersectin SH3A-E auf die Expression von M₂ und M₁ mAChRen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden wie in Abb. 3.11 und 3.14 angegeben mit dem M₂ oder M₁ mAChR und den isolierten SH3A-E-Domänen von Intersectin bzw. Grb2 NSH3 kotransfiziert. Anschließend wurde in Homogenaten dieser Zellen die mAChR-Zahl (in fmol/Loch einer 24-Lochplatte) mit dem Radioliganden [³H]QNB bestimmt.

mAChR-Subtyp	Grb2 NSH3	SH3A	SH3B	SH3C	SH3D	SH3E
M₂ mAChR	168 ± 27	28 ± 9	9 ± 2	16 ± 3	15 ± 4	30 ± 3
M₁ mAChR	249 ± 38	26 ± 4	33 ± 7	27 ± 3	32 ± 7	26 ± 4

Dann wurde geprüft, ob die isolierten Intersectin SH3-Domänen die Internalisierung des M₂ mAChRs beeinflussen. Dazu wurde der M₂ mAChR zusammen mit den SH3A-E-Domänen oder Grb2 NSH3 in HEK293 tsA201-Zellen exprimiert und die Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation der Zellen für 5, 15 und 60 min mit 10 µM Carbachol untersucht. Im Vergleich zu den mit Grb2 NSH3 transfizierten Zellen internalisierte der M₂ mAChR in Zellen, die die SH3A-, SH3B- oder SH3C-Domäne von Intersectin exprimierten, in ähnlicher Weise (Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu wurde durch die Expression der Intersectin SH3D- und SH3E-Domänen die Geschwindigkeit der Internalisierung des M₂ mAChRs, jedoch nicht das maximale Ausmaß deutlich gehemmt.

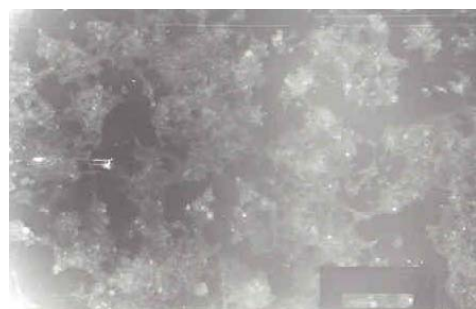
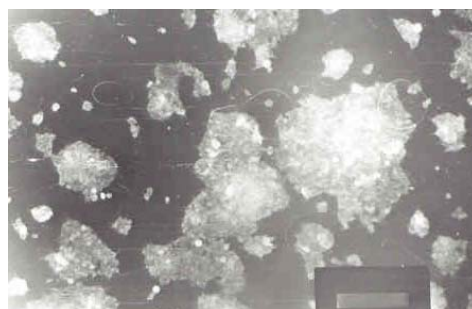
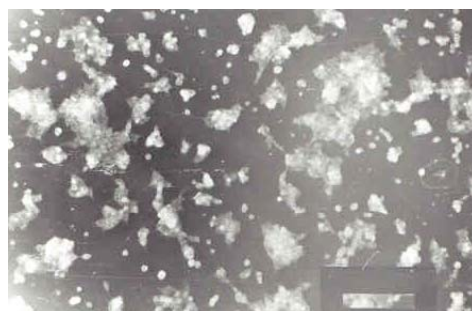
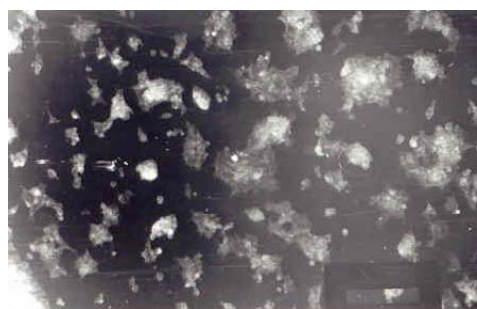
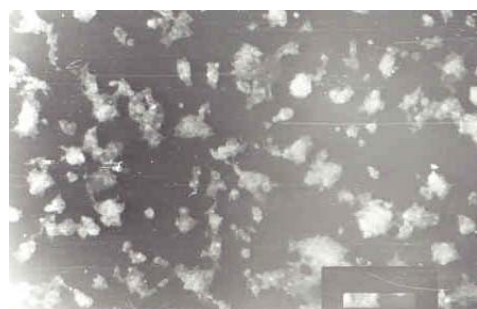
**pcDNA3.1****Grb2 NSH3****Intersectin SH3A****Intersectin SH3B****Intersectin SH3C****Intersectin SH3D****Intersectin SH3E**

Abb. 3.11: Heterologe Expression der Intersectin SH3A-E Domänen in HEK293 tsA201-Zellen.

Die Zellen wurden mit je 150 µg leerem pcDNA3.1, Grb2 NSH3 in pCMVmyc oder Intersectin SH3A-E pCMV3 Tag-myc zusammen mit 25 µg M₂ mAChR in pCD-PS transfiziert. Die Expression der SH3-Domänen wurde mit dem anti-c-myc-Antikörper und dem sekundären anti-Maus FITC-Antikörperkonjugat detektiert.

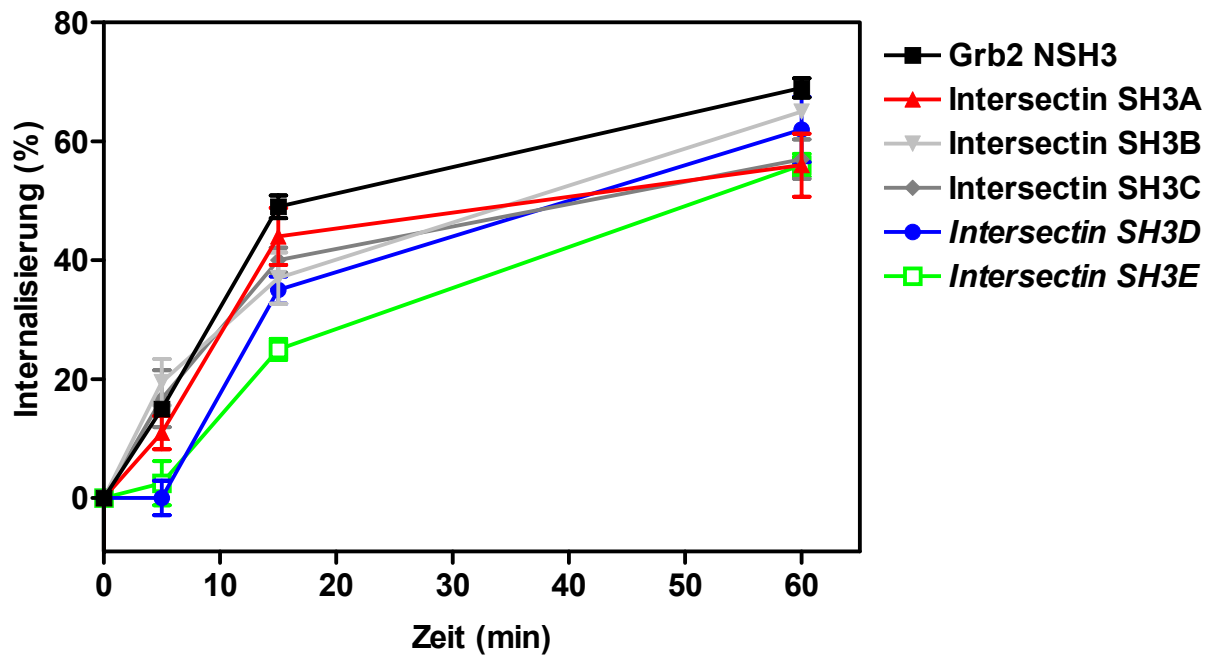


Abb. 3.12: Einfluß der isolierten Intersectin SH3A-E-Domänen auf die Internalisierung des M_2 mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 μ g M_2 mAChR in pCD-PS zusammen mit je 150 μ g Grb2 NSH3 in pCMVmyc oder Intersectin SH3A, SH3B, SH3C, SH3D und SH3E kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne und mit 10 μ M Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

In Immunpräzipitations-Experimenten mit Proteinextrakten aus Rattenhirn wurde jede einzelne Intersectin SH3-Domäne auf ihre Interaktion mit zwei an der Endozytose beteiligten Proteine untersucht, nämlich Dynamin und Synaptojanin. Dabei wurde gezeigt, daß die SH3E-, jedoch nicht die SH3D-Domäne von Intersectin eine starke Bindung an Dynamin aufweist (Yamabhai *et al.*, 1998). Da Dynamin ein essentielles Protein für die Internalisierung der mAChRs darstellt (Vögler *et al.*, 1998; Werbonat *et al.*, 2000; van Koppen *et al.*, 2001) überprüfen wir, ob die durch Intersectin SH3D und SH3E induzierte Hemmung der Internalisierung des M_2 mAChRs durch Überexpression von Dynamin aufgehoben werden kann. In Übereinstimmung mit den in Abb. 3.12 gezeigten Befunden hemmte sowohl die Expression der Intersectin SH3D- als auch der SH3E-Domäne die Internalisierung des M_2 mAChRs um ca. 50% oder mehr im Vergleich zu Grb2 NSH3-exprimierenden Kontrollzellen (Abb. 3.13). Die Überexpression von Dynamin hatte keinen Einfluß auf die Internalisierung des M_2 mAChRs, wie bereits früher gezeigt worden war (Vögler *et al.*, 1998; Werbonat *et al.*, 2000). Durch Koexpression von Dynamin wurde die durch die SH3D-Domäne induzierte Hemmung

der Internalisierung des M₂ mAChRs nicht geändert. Im Gegensatz dazu wurde die durch die SH3E-Domäne induzierte Hemmung der Internalisierung durch Überexpression von Dynamin vollständig aufgehoben (Abb. 3.13). Die Koexpression von Dynamin mit den Intersectin SH3D- und SH3E-Domänen veränderte nicht die durch diese Domänen reduzierte Expression des M₂ mAChRs (siehe Tab. 3.2) (nicht gezeigt). Das bedeutet, daß Dynamin spezifisch die Hemmung der Internalisierung des M₂ mAChRs durch die SH3E-Domäne von Intersectin unterdrückt.

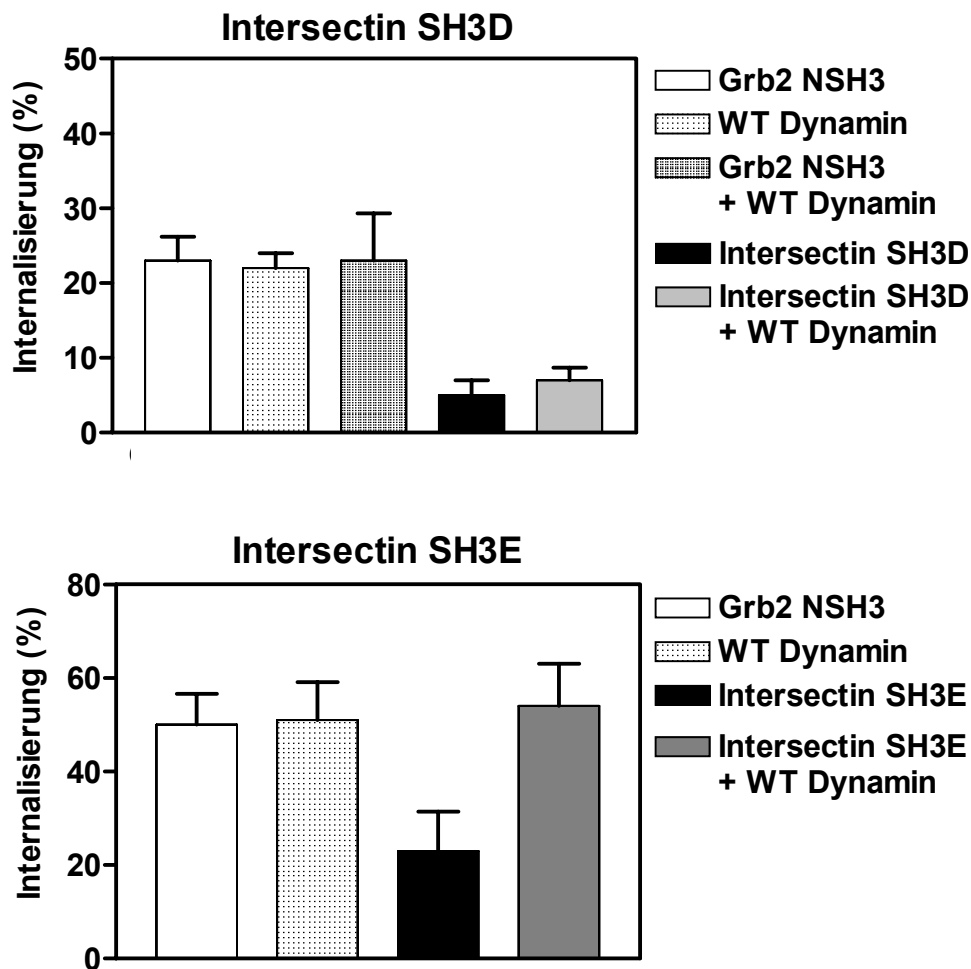


Abb. 3.13: Einfluß von Dynamin auf die durch Intersectin SH3D und SH3E induzierte Hemmung der Internalisierung des M₂ mAChRs.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 µg M₂ mAChR in pCD-PS und je 150 µg Grb2 NSH3 in pCMVmyc, Intersectin SH3D bzw. SH3E in pGEX-2TK, 5 µg Dynamin oder Intersectin SH3D bzw. SH3E plus Dynamin kotransfiziert, wobei die Gesamtmenge an DNA konstant gehalten wurde. Die Zellen wurden anschließend für 10 min (SH3D) bzw. 15 min (SH3E) ohne und mit 10 µM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Einfluß von Intersectin auf die Internalisierung des M₁ mAChRs

Im Folgenden wurde der Einfluß der isolierten Intersectin SH3A-E-Domänen auf die Clathrin-abhängige Internalisierung des M₁ mAChRs untersucht (van Koppen, 2001). Dazu wurde in HEK293 tsA201-Zellen der M₁ mAChR zusammen mit den isolierten SH3A-E-Domänen oder der Kontrolle Grb2 NSH3 exprimiert. Die Internalisierung des M₁ mAChRs wurde mit 1 mM Carbachol induziert. Im Gegensatz zum M₂ mAChR wurde die Internalisierung des M₁ mAChRs durch die Expression keiner der Intersectin SH3-Domänen gehemmt (Abb. 3.14). Im Gegensatz, durch die Expression der Intersectin SH3A-, SH3B-, SH3D- und SH3E-Domänen wurde die Geschwindigkeit der Internalisierung im Vergleich zur Kontrolle (Grb2 NSH3) signifikant gesteigert, wie Analysen zum Zeitpunkt 15 min zeigten. Hier betrug die Internalisierung in Zellen, die Grb2 NSH3, Intersectin SH3A, SH3B, SH3D bzw. SH3E exprimierten, $29 \pm 2\%$, $52 \pm 3\%$, $39 \pm 4\%$, $43 \pm 4\%$ bzw. $44 \pm 4\%$. Dagegen hatten die Intersectin SH3B- und SH3C-Domänen keinerlei Einfluß auf die Internalisierung der M₁ mAChRs (Abb. 3.14).

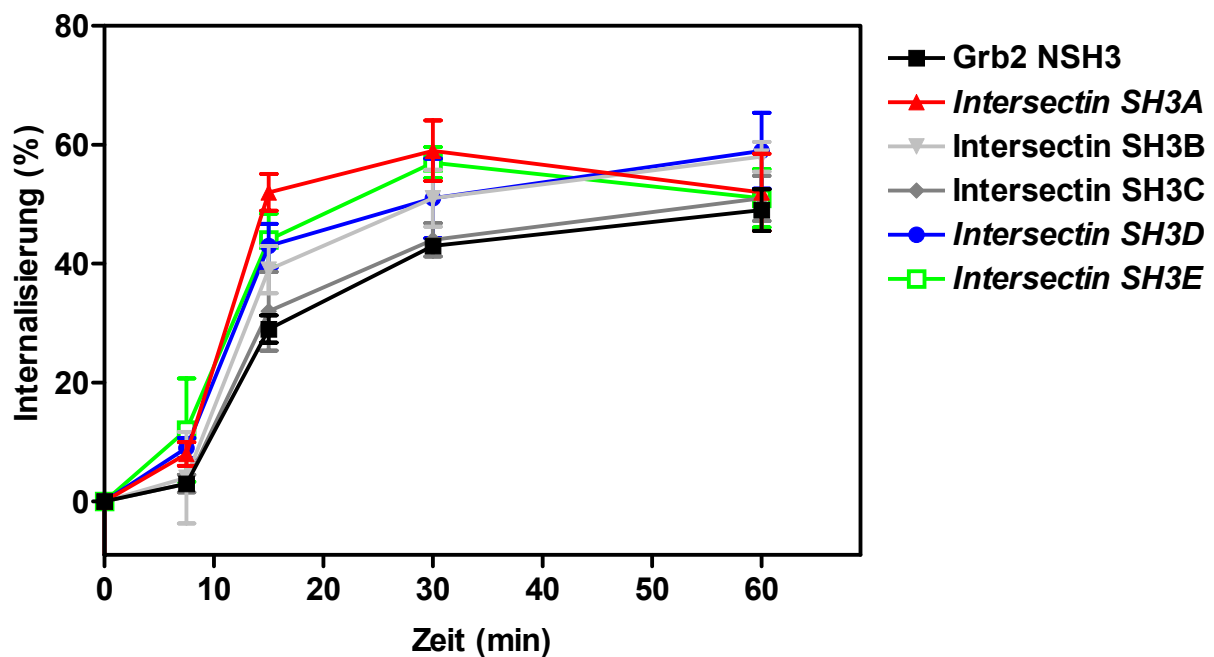


Abb. 3.14: Einfluß der isolierten Intersectin SH3A-E-Domänen auf die Internalisierung des M₁ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 12,5 µg M₁ mAChR cDNA zusammen mit je 150 µg Grb2 NSH3 in pCMVmyc oder Intersectin SH3A, SH3B, SH3C, SH3D und SH3E kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne und mit 1 mM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 unabhängigen Versuchen.

Insgesamt kann also hinsichtlich einer Beteiligung von Intersectin bei der Internalisierung des M₁ und M₂ mAChRs folgendes festgehalten werden: Expression von Intersectin hemmt die Clathrin-unabhängige Internalisierung des M₂ mAChRs. Hierfür sind anscheinend die SH3D- und SH3E-Domänen von Intersectin entscheidend. Für die inhibitorische Wirkung der SH3E-Domäne ist offensichtlich eine Interaktion mit Dynamin verantwortlich, während die SH3D-Domäne über eine bisher nicht identifizierte Interaktion die Internalisierung des M₂ mAChRs hemmt. Im Gegensatz zum M₂ mAChR wird die Geschwindigkeit der Clathrin-abhängigen Internalisierung des M₁ mAChRs durch Expression bestimmter SH3-Domänen von Intersectin gesteigert.

3.3 Rolle von Endophilin bei der Internalisierung von mAChRen

Untersuchungen an anderen GPCRen, nämlich dem β_2 -Adrenozeptor und dem Angiotensin AT_{1A}-Rezeptor, hatten Hinweise dafür erbracht, daß Endophilin bei der Internalisierung dieser Rezeptoren beteiligt ist (Tang *et al.*, 1999; Szaszák *et al.*, 2002). In dieser Arbeit sollte eine mögliche Beteiligung von Endophilin an der Internalisierung der mAChR-Subtypen M₁ - M₄ untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst Endophilin-1 in HEK293 tsA201-Zellen transient exprimiert und die Folge dieser Expression auf die Internalisierung der mAChR-Subtypen M₁ und M₂ untersucht. Expression von Endophilin-1, ein 40 kDa-Protein, hatte keinen Einfluß auf die durch Carbachol induzierte Internalisierung dieser Rezeptoren, gleich ob die Internalisierung zu einem frühen Zeitpunkt (15 min) oder zu einem späten Zeitpunkt (60 min) gemessen wurde (Abb. 3.15).

Weiterhin wurde geprüft, ob durch Aktivierung dieser Rezeptoren die subzelluläre Verteilung von Endophilin geändert wird. Hierfür wurden HEK293 tsA201-Zellen mit dem M₁ oder M₂ mAChR ohne oder mit Endophilin-1 transfiziert und dann für 7,5 min ohne oder mit 100 μ M Carbachol stimuliert. Anschließend wurde in Zytosol- und Membranfraktionen dieser Zellen der Gehalt an Endophilin-1 mittels Westernblot bestimmt. Wie Abb. 3.16 zeigt, ist das exprimierte Endophilin-1 sowohl im Zytosol als auch in der Membranfraktion zu finden. Stimulation der Zellen mit Carbachol änderte die subzelluläre Verteilung von Endophilin-1 nicht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach längerer Inkubation (30 min) mit Carbachol sowie mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erzielt (nicht gezeigt).

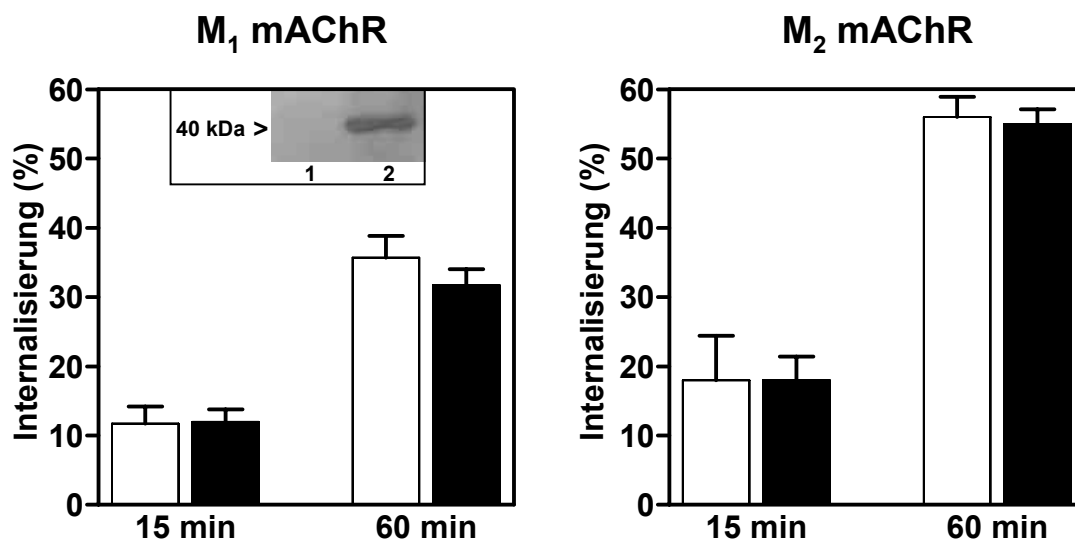


Abb. 3.15: Einfluß von Endophilin-1 auf die Internalisierung von M₁ und M₂ mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 12,5 µg M₁ oder 25 µg M₂ mAChR cDNA in pCD-PS zusammen mit leerem pcDNA3.1 (weiße Säulen) oder 15 µg Endophilin-1 (schwarze Säulen) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne und mit 1 mM (M₁) bzw. 10 µM (M₂) Carbachol für 15 und 60 min inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen. Das Inset stellt die Expression von Endophilin-1 (Spur 2) im Vergleich zu Kontrollzellen (Spur 1), analysiert im Westernblot mit einem anti-Endophilin-1-Antikörper, dar.

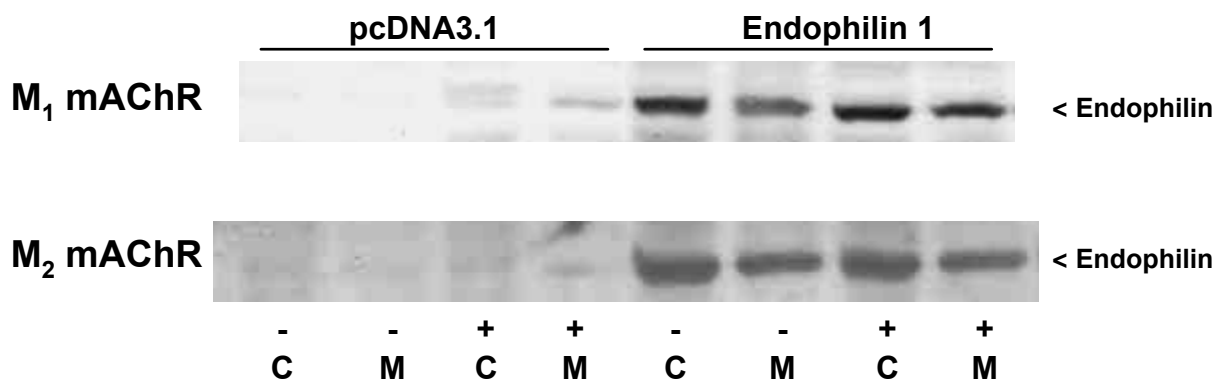


Abb. 3.16: Subzelluläre Verteilung von Endophilin-1.

HEK293 tsA201-Zellen wurden wie in Abb. 3.15 angegeben transfiziert. Anschließend wurden die Zellen ohne (-) oder mit (+) 100 µM Carbachol für 7,5 min stimuliert. Nach Auftrennung in eine Zytosol- (C) und Membranfraktion (M) wurde der Gehalt dieser Fraktionen an Endophilin-1 mit einem spezifischen anti-Endophilin-1-Antikörper bestimmt.

Die bisher erhobenen Daten zeigten also, daß starke Expression von Endophilin-1 in HEK293 tsA201-Zellen die Internalisierung sowohl des M₁ als auch des M₂ mAChRs nicht beeinflußt und daß auch die subzelluläre Lokalisation von Endophilin-1 unabhängig ist von

der Aktivierung dieser Rezeptoren. Endophilin interagiert über seine SH3-Domäne mit Prolin/Arginin-reichen Domänen (PRD) anderer Proteine. Dies wurde spezifisch für die Proteine Dynamin, Synaptojanin und Amphiphysin gezeigt, Proteine, die bekanntermaßen an der Endozytose von Vesikeln beteiligt sind (de Heuvel *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997).

Es wurde deshalb geprüft, ob durch Expression der isolierten SH3-Domäne von Endophilin (EndoSH3), was die Wirkung von endogenem Endophilin stören sollte, die Internalisierung von mAChRen beeinflusst werden kann. Dazu wurden HEK293 tsA201-Zellen zunächst mit M_1 und M_3 mAChRen zusammen mit EndoSH3 oder zur Kontrolle mit Grb2 NSH3 kotransfiziert und dann mit 1 mM Carbachol inkubiert. Wie in Abbildung 3.17 gezeigt, wurde durch die Expression von EndoSH3 weder die Geschwindigkeit noch das maximale Ausmaß der Internalisierung von M_1 und M_3 mAChRen, im Vergleich zu Grb2 NSH3-exprimierenden Kontrollzellen, signifikant beeinflusst.

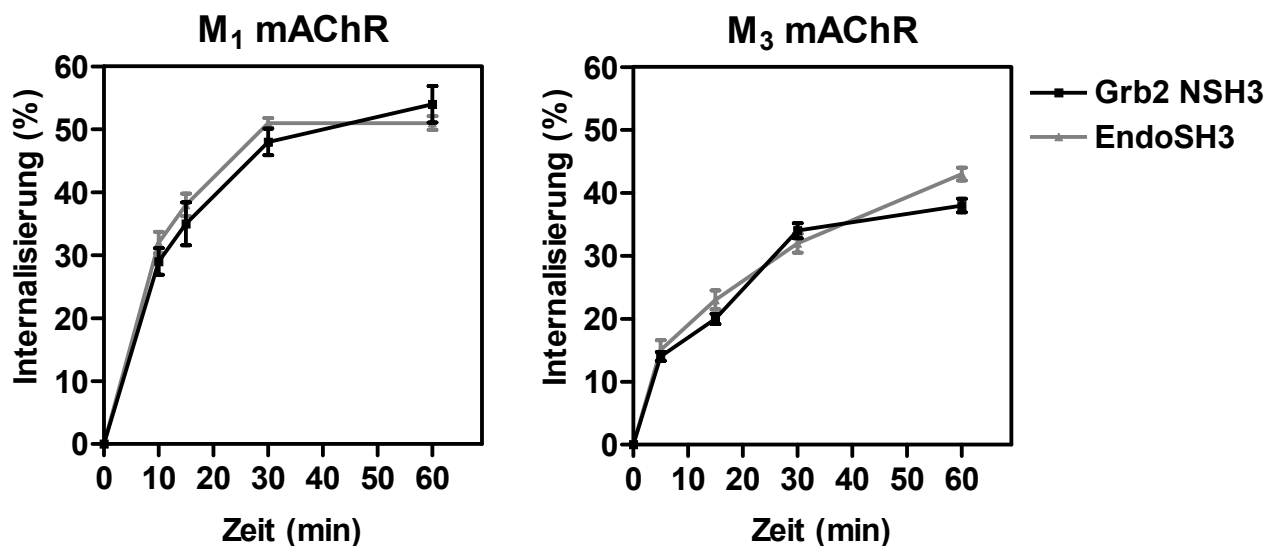


Abb. 3.17: Einfluß von EndoSH3 auf die Internalisierung von M_1 und M_3 mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit je 25 μ g M_1 oder M_3 mAChR cDNA in pCD-PS zusammen mit je 150 μ g EndoSH3 oder Grb2 NSH3 kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne oder mit 1 mM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

Anschließend wurde untersucht, ob Expression von EndoSH3 die Internalisierung der G_i -gekoppelten M_2 und M_4 mAChRen beeinflusst. Wie in Abb. 3.18 dargestellt, führte die Expression von EndoSH3 zu einer signifikanten Hemmung der Internalisierung des M_2 mAChRs, im Vergleich zu Grb2 NSH3-exprimierenden Kontrollzellen. Diese Hemmung

betraf sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den M₄ mAChR erzielt (siehe Abb. 3.19).

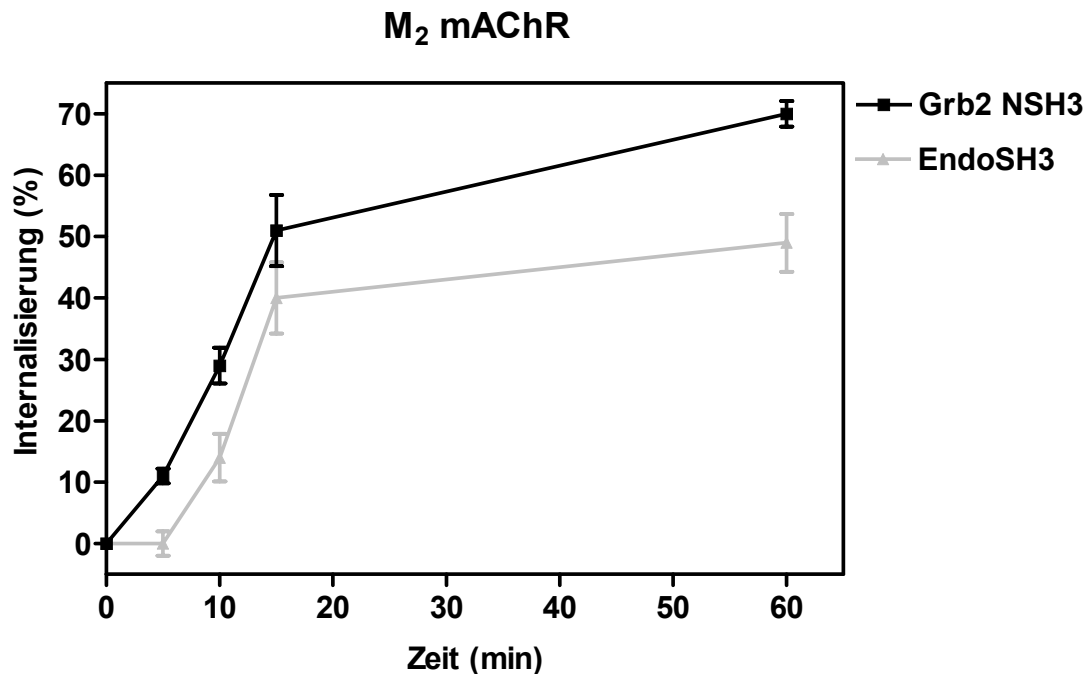


Abb. 3.18: Einfluß von EndoSH3 auf die Internalisierung des M₂ mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen. HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 µg M₂ mAChR cDNA zusammen mit je 150 µg EndoSH3 oder Grb2 NSH3 kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne oder mit 10 µM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Im Folgenden wurde untersucht, über welchen Mechanismus die SH3-Domäne von Endophilin-1 die Hemmung der Internalisierung von M₂ und M₄ mAChRen bewirkt. Verschiedene Studien hatten gezeigt, daß Endophilin ein wichtiger Bindungspartner der Inositol-5-Phosphatase Synaptojanin ist und über seine SH3-Domäne die Aktivität von Synaptojanin reguliert (de Heuvel *et al.*, 1997; Micheva *et al.*, 1997). Kürzliche Untersuchungen an A431-Zellen hatten gezeigt, daß durch die Expression der isolierten EndoSH3-Domäne der zelluläre Gehalt an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂), was für die Wirkung verschiedener an der Endozytose beteiligter Proteine essentiell ist, abnimmt (Hill *et al.*, 2001).

Um zu prüfen, ob ein solcher Mechanismus für die Hemmung der Internalisierung von M₂ und M₄ mAChRen verantwortlich ist, wurde der Gehalt an PI(4,5)P₂ in HEK293-Zellen untersucht, die stabil Wildtyp Endophilin-1, EndoSH3 oder den leeren pcDNA3.1-Vektor exprimieren. Es konnten unabhängig vier G418-resistente Zellklone isoliert werden, von denen jeweils der zelluläre Gehalt an PI(4,5)P₂ bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den in

A431 Zellen erhobenen Daten (Hill *et al.*, 2001) konnten keine signifikanten Veränderungen im zellulären Gehalt an PI(4,5)P₂ in den HEK293-Zellklonen gefunden werden, weder durch die Expression von Wildtyp Endophilin-1 noch von EndoSH3 (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Einfluß von Endophilin-1 und EndoSH3 auf den zellulären Gehalt an PI(4,5)P₂.

Es wurden jeweils 4 unabhängige, G418-resistente HEK293-Zellklone isoliert, die stabil Wildtyp Endophilin-1, EndoSH3 oder den leeren pcDNA3.1 Vektor exprimierten. In diesen Zellen wurde der Gehalt an PI(4,5)P₂ wie in „Materialien und Methoden“ beschrieben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.

HEK293-Zellen	pcDNA3.1	Endophilin-1	EndoSH3
PI(4,5)P ₂ -Gehalt [nmol x mg ⁻¹ Protein]	4,1 \pm 0,5	3,0 \pm 0,7	3,6 \pm 0,4

Eine weitere Möglichkeit, wie EndoSH3 die Internalisierung von mAChRs hemmt, ist, daß es direkt mit dem Rezeptor interagiert. In Studien am β_1 -Adrenozeptor wurde gezeigt, daß Endophilin-1 über seine SH3-Domäne direkt an die Prolin/Arginin-reiche dritte zytoplasmatische Schleife des Rezeptors bindet (Tang *et al.*, 1999). Um einen solchen möglichen Wirkungsmechanismus zu untersuchen, wurde eine Mutante des M₄ mAChRs (Δ 264-394 M₄ mAChR) benutzt, bei der die Prolin/Arginin-reiche dritte zytoplasmatische Schleife deletiert ist. Bei den anderen mAChR-Subtypen (M₁, M₂ und M₃) liegen solche Prolin/Arginin-reichen Motive nicht vor (van Koppen *et al.*, 1994). Wie aus Abb. 3.19 jedoch hervorgeht, hatte die Expression von EndoSH3 eine gleich stark hemmende Wirkung auf die Agonist-induzierte Internalisierung des Δ 264-394 M₄ mAChRs wie auf die des Wildtyp Rezeptors. Dieses Ergebnis zeigt, daß Endophilin anscheinend nicht direkt mit der dritten zytoplasmatischen Schleife des M₄ mAChRs interagiert.

Da Endophilin mit Dynamin interagiert, wurde abschließend geprüft, ob die hemmende Wirkung von EndoSH3 durch Überexpression von Dynamin aufgehoben kann. Die Überexpression von Dynamin, ob allein oder mit Grb2 NSH3, hatte keinen Einfluß auf die Internalisierung des M₂ mAChRs. Dagegen wurde die hemmende Wirkung von EndoSH3 durch Koexpression mit Dynamin vollständig aufgehoben (Abb. 3.20).

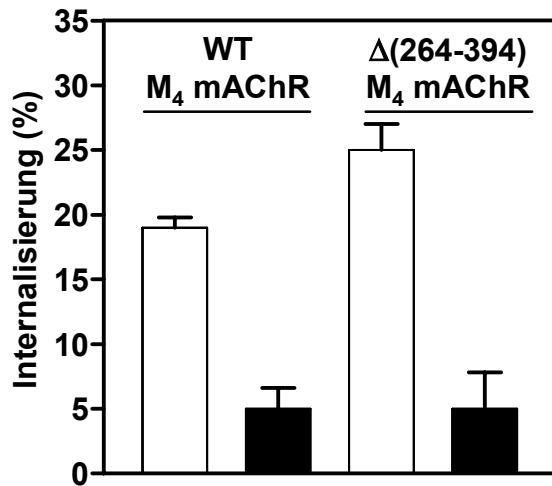


Abb. 3.19: Einfluß von EndoSH3 auf die Internalisierung der Δ(264-394) M₄ mAChR-Mutante.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit je 25 µg Wildtyp (WT) M₄ mAChR oder Δ(264-394) M₄ mAChR zusammen mit je 150 µg EndoSH3 (schwarze Balken) oder Grb2 NSH3 (weiße Balken) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min ohne oder mit 10 µM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Versuchen.

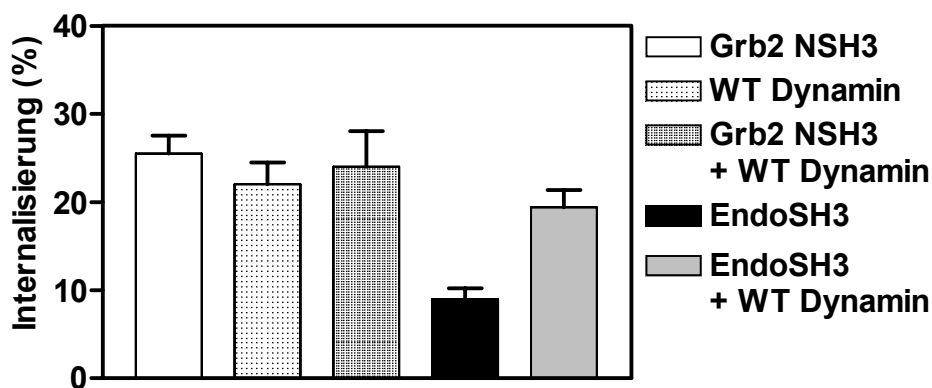


Abb. 3.20: Einfluß von Dynamin auf die durch EndoSH3 induzierte Hemmung der Internalisierung des M₂ mAChRs.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 12,5 µg M₂ mAChR in pCD-PS zusammen mit je 150 µg Grb2 NSH3, EndoSH3, 5 µg Dynamin, Grb2 SH3 plus Dynamin oder EndoSH3 plus Dynamin transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min ohne oder mit 10 µM Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit legen also nahe, daß Endophilin bei der Internalisierung von M₂ und M₄, aber nicht von M₁ und M₃ mAChRen beteiligt ist. Die Hemmung der Internalisierung von M₂ und M₄ mAChRen durch Expression der SH3-Domäne von Endophilin beruht anscheinend nicht auf einer Interaktion mit oder Aktivierung der Inositol-5-

Phosphatase Synaptojanin noch auf einer direkten Interaktion mit den Rezeptoren. Die „antagonisierende“ Wirkung von Dynamin läßt dagegen den Schluß zu, daß die isolierte SH3 Domäne die Interaktion von endogenem Endophilin mit Dynamin, die für die eine ungestörte Internalisierung erforderlich ist, stört.

3.4 Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Down-Regulation des M₂ mAChRs

In vorangegangenen Studien war gezeigt worden, daß der M₂ mAChR in Abhängigkeit von Dynamin, aber im Unterschied zu M₁, M₃ und M₄ mAChRen in einer β -Arrestin-, c-Src- und Clathrin-unabhängigen Weise internalisiert (Vögler *et al.*, 1999; Werbonat *et al.*, 1999; Krudewig *et al.*, 2000). Darüber hinaus kehren internalisierte M₂ mAChRen nicht wie M₁, M₃ und M₄ mAChRen wieder an die Plasmamembran zurück, sondern werden intrazellulär abgebaut (van Koppen, 2001). Es war deshalb von Interesse, ob das Ubiquitin-Proteasom-System potentiell an der Internalisierung und dem Abbau der M₂ mAChRen beteiligt ist. Zur Untersuchung des Ubiquitin-Proteasom-Systems standen die vektorkodierten cDNAs von Wildtyp Ubiquitin und der Ubiquitin K48R-Mutante zur Verfügung. Die Mutation von Lysin zu Arginin an der Aminosäureposition 48 der Ubiquitin K48R-Mutante führt zur Termination der entstehenden Ubiquitin-Isopeptidkette, d.h. die Zielsubstrate können durch die Ubiquitin K48R-Mutante lediglich mono-ubiquitinyliert, jedoch nicht multi-ubiquitinyliert werden, was für den proteasomalen Abbau erforderlich ist (siehe Abb. 1.5).

3.4.1 Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Desensibilisierung des M₂ mAChRs

Zunächst wurde geprüft, ob Ubiquitin möglicherweise eine Rolle bei der Internalisierung des M₂ mAChRs spielt. Hierzu wurde der M₂ mAChR ohne und mit Wildtyp Ubiquitin oder Ubiquitin K48R in HEK293 tsA201-Zellen exprimiert und die durch 10 μ M und 1 mM Carbachol induzierte Internalisierung des Rezeptors untersucht. Wie in Abb. 3.21 dargestellt, hatte die Überexpression von Wildtyp Ubiquitin keinen Einfluß auf die durch Carbachol induzierte Internalisierung des M₂ mAChRs. Dagegen waren in Zellen, die die Ubiquitin-Mutante exprimierten, sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung des Rezeptors deutlich vermindert. Dieser negative Effekt von Ubiquitin K48R war unabhängig von der verwendeten Carbachol-Konzentration. Kontrollversuche

mittels [^3H]QNB-Bindung zeigten, daß weder die Expression von Wildtyp Ubiquitin noch von Ubiquitin K46R die Expression des M_2 mAChRs änderten (nicht gezeigt).

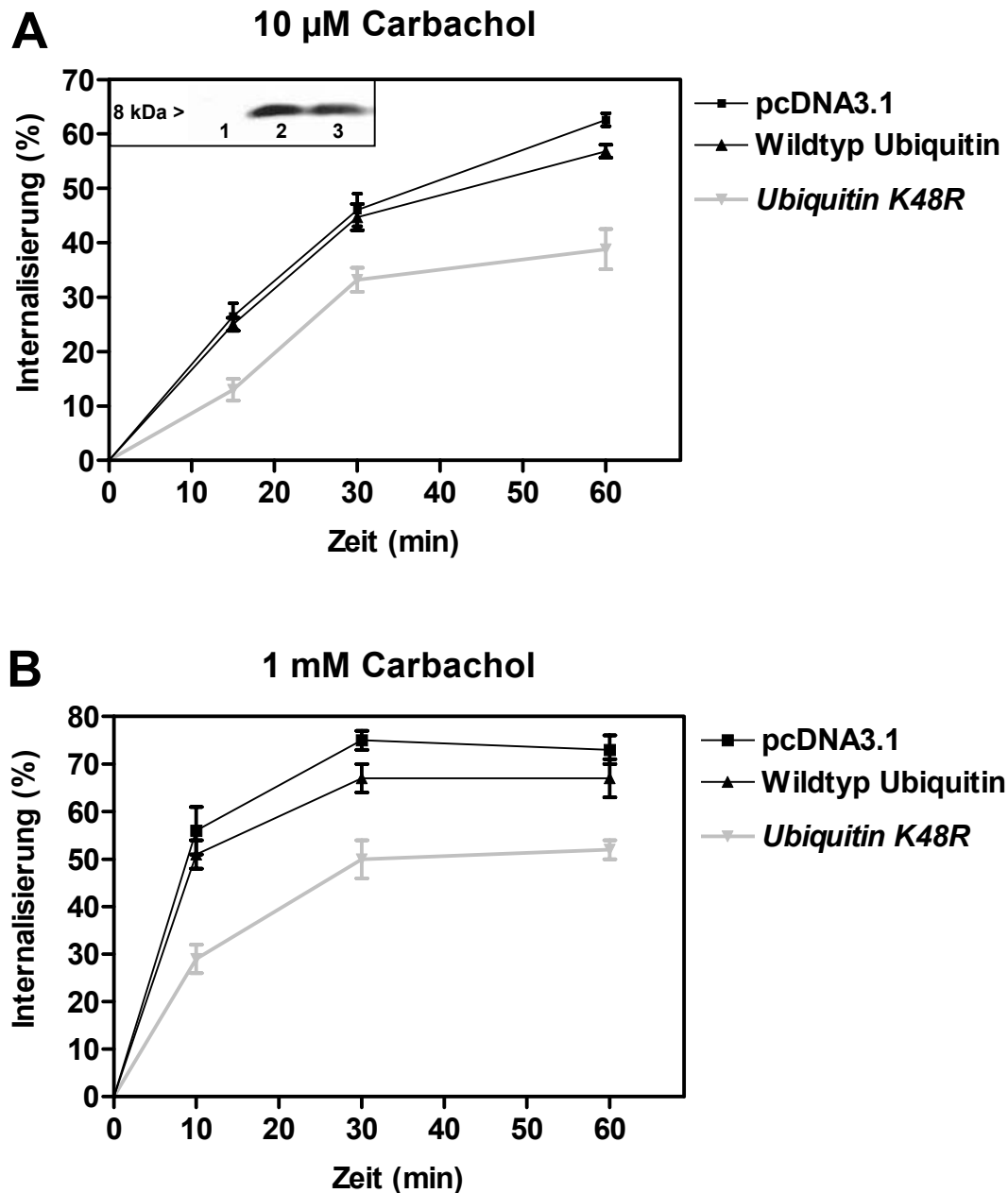


Abb. 3.21: Einfluß von Wildtyp Ubiquitin und Ubiquitin K48R auf die Internalisierung des M_2 mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 μg pCD-PS M_2 mAChR zusammen mit je 50 μg leerer pcDNA3.1 DNA, pRBG4 Wildtyp Ubiquitin oder pRBG4 Ubiquitin K48R transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten ohne und mit 10 μM (A) oder 1 mM (B) Carbachol inkubiert. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde wie in Abb. 3.3 angegeben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 6 (A) bzw. 7 (B) unabhängigen Versuchen. Im oberen Teil ist die Expression von Wildtyp Ubiquitin (Spur 2) und Ubiquitin K48R (Spur 3) im Vergleich zu Kontrollzellen (Spur 1), analysiert im Westernblot mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper, dargestellt.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob Ubiquitin auch bei der Internalisierung anderer mAChR-Subtypen eine Rolle spielt. Deshalb wurden ähnliche Untersuchungen am M_1 und M_4 mAChR durchgeführt. Die Internalisierung dieser mAChR-Subtypen wurden weder durch die Expression von Wildtyp Ubiquitin noch von Ubiquitin K48R beeinflusst (nicht gezeigt).

Da Ubiquitin K48R also offensichtlich spezifisch die Internalisierung des M_2 mAChRs hemmte, wurde im Folgenden geprüft, ob durch Expression von Wildtyp Ubiquitin oder Ubiquitin K48R auch die Desensibilisierung des M_2 mAChRs geändert wird. Dazu wurden HEK293 tsA201-Zellen, die den M_2 mAChR ohne und mit Wildtyp Ubiquitin oder Ubiquitin K48R exprimierten, für 1 min ohne und mit 1 mM Carbachol vorbehandelt. Anschließend wurde in Membranen dieser so vorbehandelten Zellen die durch Carbachol induzierte Bindung von [35 S]GTP γ S an G-Proteine als Maß für die Rezeptor-Aktivität bzw. seine Desensibilisierung bestimmt. Die Abb. 3.22 zeigt, daß weder die Expression von Wildtyp Ubiquitin noch von Ubiquitin K48R einen signifikanten Einfluß auf die M_2 mAChR-Aktivität und seine Desensibilisierung hatten. Unabhängig von der Expression von Wildtyp Ubiquitin oder Ubiquitin K48R betrug die Desensibilisierung etwa 40-50%.

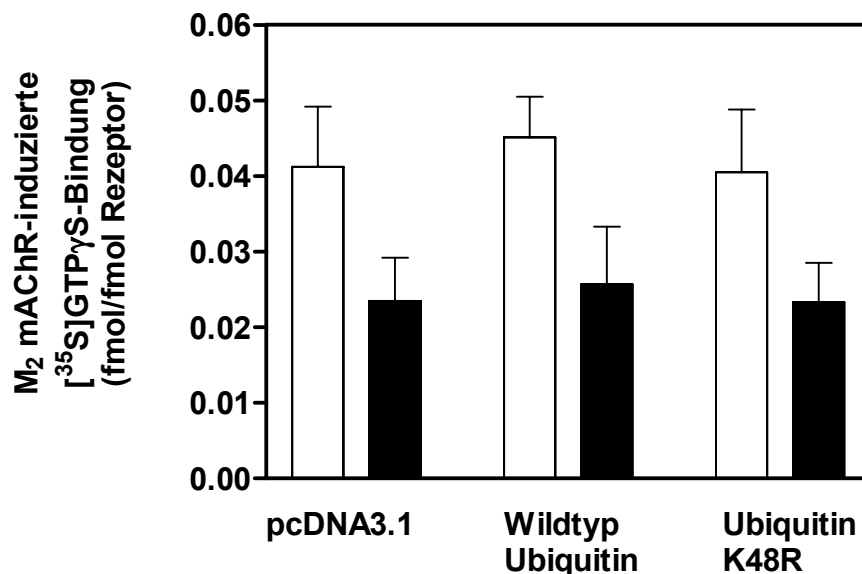


Abb. 3.22: Einfluß von Wildtyp Ubiquitin und Ubiquitin K48R auf die Desensibilisierung des M_2 mAChRs in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 μ g M_2 mAChR cDNA in pCD-PS zusammen mit je 50 μ g leerer pcDNA3.1 DNA, pRBG4 Wildtyp Ubiquitin oder pRBG4 Ubiquitin K48R transfiziert und dann für 1 min ohne (weiße Balken) und mit 1 mM Carbachol (schwarze Balken) inkubiert. Anschließend wurden in Membranen dieser Zellen die durch 1 mM Carbachol induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung und die M_2 mAChR-Zahl bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

3.4.2 Rolle von Ubiquitin bei der Down-Regulation des M₂ mAChRs

Eine langfristige Stimulation von Rezeptoren, so auch von mAChRen, führt häufig zu einer Reduktion der Gesamtrezeptorzahl (Down-Regulation). In den letzten Jahren wurde für verschiedene Rezeptoren gezeigt, daß es hierbei zu einem Abbau von Rezeptoren kommt, bei dem die Rezeptoren und/oder zytosolische Proteine multi-ubiquitinyliert werden (Strous und Govers, 1999; van Kerkhof *et al.*, 2000; Longva *et al.*, 2002), ein Signal für den Abbau der Proteine im Proteasom und/oder Lysosom (Strous und Govers, 1999; Katzmann *et al.*, 2002).

Um zu prüfen, ob eine Multi-Ubiquitinylierung beim Abbau des M₂ mAChRs beteiligt ist, wurden HEK293 tsA201-Zellen, die den M₂ oder M₄ mAChR ohne oder mit Wildtyp Ubiquitin bzw. Ubiquitin K46R exprimierten, zunächst für 1 h mit Cycloheximid (350 µM) inkubiert, um die *de novo*-Synthese von Rezeptoren zu verhindern (Schmidt *et al.*, 1995), gefolgt von einer weiteren Inkubation für 5 h ohne und mit 1 mM Carbachol, um die Down-Regulation der Rezeptoren zu induzieren. Die Anzahl der verbliebenen mAChRen wurde mittels Bindung von [³H]QNB bestimmt. Wie die Abb. 3.23 zeigt, wurden durch die Behandlung von Kontrollzellen mit Carbachol etwa 20% der M₂ mAChRen abgebaut. Dieser Rezeptor-Abbau wurde durch die Überexpression von Wildtyp Ubiquitin nicht verändert, aber durch die Expression von Ubiquitin K48R vollständig blockiert. Dagegen hatten weder Wildtyp Ubiquitin noch Ubiquitin K48R einen Einfluß auf den Abbau der M₄ mAChRen.

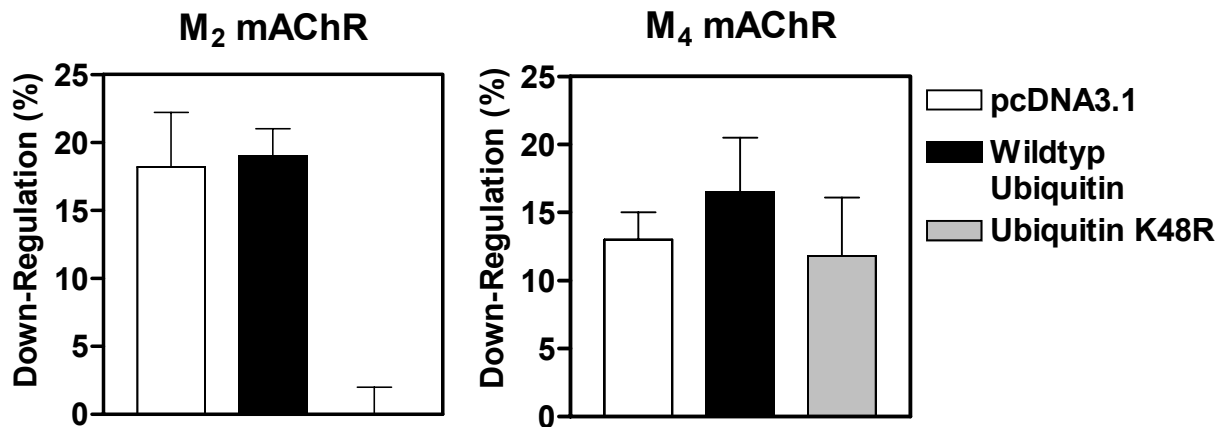


Abb. 3.23: Einfluß von Wildtyp Ubiquitin und Ubiquitin K48R auf den Agonist-induzierten Abbau von M₂ und M₄ mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden transient mit je 25 µg M₂ oder M₄ mAChR pCD-PS zusammen mit je 50 µg leerer pcDNA3.1 DNA, pRBG4 Wildtyp Ubiquitin oder pRBG4 Ubiquitin K48R transfiziert, dann für 1 h mit 350 µM Cycloheximid inkubiert, gefolgt von einer 5 h Inkubation ohne und mit 1 mM Carbachol in ständiger Anwesenheit von Cycloheximid. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM der durch Carbachol induzierten Down-Regulation von mAChRen, bestimmt mittels Bindung von [³H]QNB in Zellhomogenaten, aus 4 unabhängigen Versuchen.

Schließlich wurde geprüft, über welchen Weg, d.h. proteasomal oder lysosomal, die M₂ und M₄ mAChRen abgebaut werden. Für diese Untersuchungen wurden der proteasomale Hemmstoff Lactacystin (Craiu *et al.*, 1996) und die lysosomalen Hemmstoffe Chloroquin und Ammoniumchlorid eingesetzt. HEK293 tsA201-Zellen, die den M₂ oder M₄ mAChR exprimierten, wurden zunächst mit 10 µM Lactacystin, 100 µM Chloroquin oder 10 mM Ammoniumchlorid für 1 h behandelt und anschließend für weitere 5 h ohne und mit 1 mM Carbachol in Anwesenheit der Hemmstoffe und 350 µM Cycloheximid inkubiert. Wie aus Abb. 3.24 hervorgeht, wurden in Kontrollzellen etwa 20% der M₂ und M₄ mAChRen nach 5 stündiger Inkubation mit Carbachol abgebaut. Die Behandlung mit dem proteasomalen Hemmstoff Lactacystin hatte keinen Effekt auf die Down-Regulation der M₄ mAChRen, blockierte aber vollständig den Abbau der M₂ mAChRen. Überraschenderweise blockierten die lysosomalen Hemmstoffe Chloroquin und Ammoniumchlorid den Abbau beider mAChR-Subtypen.

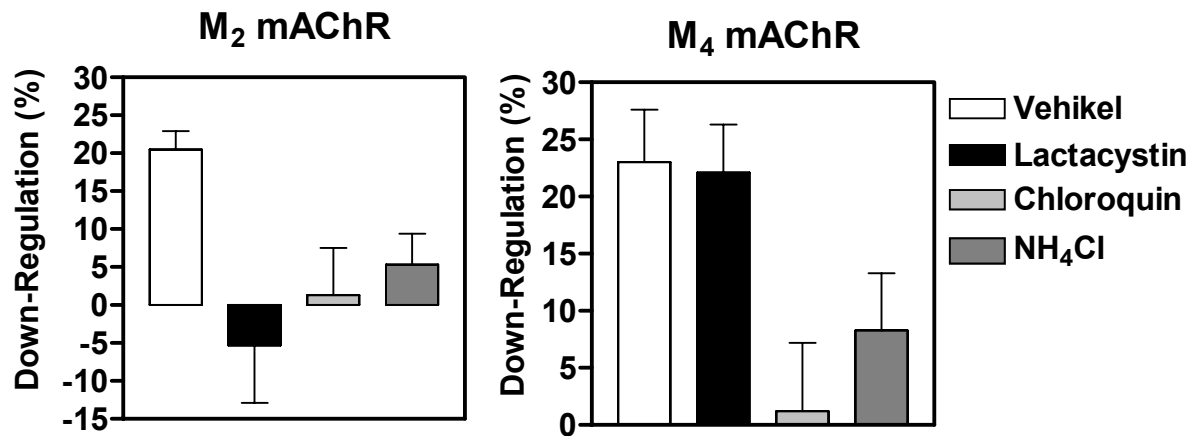


Abb. 3.24: Analyse des Abbauweges von M₂ und M₄ mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

HEK293 tsA201-Zellen wurden mit 25 µg M₂ oder M₄ mAChR pCD-PS transfiziert, dann für 1 h mit 350 µM Cycloheximid ohne (DMSO) und mit 10 µM Lactacystin, 100 µM Chloroquin oder 10 mM Ammoniumchlorid vorbehandelt, gefolgt von einer 5 h Inkubation ohne und mit 1 mM Carbachol in ständiger Anwesenheit von Cycloheximid und den genannten Hemmstoffen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM der durch Carbachol induzierten Down-Regulation von mAChRen, bestimmt mittels Bindung von [³H]QNB in Zellhomogenaten, aus 4-8 unabhängigen Versuchen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß eine Multi-Ubiquitylierungsreaktion sowohl bei der Internalisierung als auch beim Abbau des M₂ mAChRs, jedoch nicht des verwandten M₄ mAChRs beteiligt ist. Der Agonist-induzierte Abbau des M₄ mAChRs erfolgt lysosomal, während der M₂ mAChR anscheinend sowohl lysosomal als auch proteasomal abgebaut wird.

4 Diskussion

4.1 Rolle der GRK2 und CK1 α bei der Desensibilisierung und Internalisierung von mAChRen

Wie in der Einleitung dargestellt, werden die Desensibilisierung und Internalisierung vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRen), darunter auch die der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRen) durch die Phosphorylierung der Agonist-aktivierten Rezeptoren initiiert. Die anschließende Bindung von β -Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor verhindert die Kopplung des Rezeptors an die heterotrimeren G-Proteine und führt so zur Abschaltung der Rezeptorwirkung oder Desensibilisierung. Die Bindung von β -Arrestin leitet darüber hinaus auch bei vielen GPCRen den Prozeß der Rezeptor-Internalisierung ein. Für die Phosphorylierung der Rezeptoren sind insbesondere die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKn) verantwortlich, wobei die GRK2 hierbei am besten untersucht ist. Zusätzlich ist bekannt, daß bestimmte mAChR-Subtypen (M_1 und M_3) auch durch die Caseinkinase 1 α (CK1 α) phosphoryliert werden können. Jedoch ist zur Funktion der CK1 α für die akute Rezeptorwirkung und deren Abschaltung sowie für die Rezeptor-Internalisierung kaum etwas bekannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, systematisch die Rolle der GRK2 und CK1 α bei der Desensibilisierung und Internalisierung der mAChR-Subtypen M_1 - M_4 in HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen zu untersuchen.

Zunächst wurden die beiden verwandten G_i -gekoppelten M_2 und M_4 mAChRen betrachtet. Für den M_2 mAChR konnte gezeigt werden, daß die GRK2 sowohl bei der Desensibilisierung als auch bei der Internalisierung dieses Rezeptors eine entscheidende Rolle spielt und daß diese Prozesse unabhängig von der CK1 α verlaufen. So konnte die Desensibilisierung des M_2 mAChRs durch Expression einer Kinase-inaktiven Mutante von GRK2 (GRK2 K220W) komplett blockiert werden, während die Kinase-inaktive Mutante von CK1 α (CK1 α K46R) keinerlei Effekt zeigte. Durch die Überexpression von Wildtyp GRK2 wurde die Desensibilisierung des M_2 mAChRs sogar leicht verstärkt.

Hinsichtlich der Internalisierung des M_2 und des M_4 mAChRs wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Durch die Expression von GRK2 K220W, nicht jedoch von CK1 α K46R, wurde die Internalisierung der beiden mAChRen gehemmt, während die Überexpression von Wildtyp GRK2 die Internalisierungsgeschwindigkeit steigerte. In der Literatur wurden zur Rolle der GRK2 bei der Internalisierung des M_2 mAChRs unterschiedliche Ergebnisse publiziert. So fand man in COS7-Zellen bei Expression von GRK2 K220W eine Hemmung

der Phosphorylierung und Internalisierung um 50%, wohingegen in HEK293-, BHK21- und CHO-Zellen die Internalisierung des M₂ mAChRs nicht beeinflusst wurde (Tsuga *et al.*, 1994; Pals-Rylaarsdam *et al.*, 1995). Dies läßt vermuten, daß die negative Wirkung der GRK2-Mutante abhängig ist vom Zelltyp und vom endogenen Gehalt an GRK2 (Ferguson, 2001).

Es ist bekannt, daß für die Phosphorylierung von Agonist-besetzten Rezeptoren die zytosolische GRK2 an freie membranständige Gβγ-Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen binden muß (Ferguson, 2001; Kohout und Lefkowitz, 2003). In Übereinstimmung damit wird in dieser Arbeit gezeigt, daß durch Expression des C-terminalen Peptids der GRK2 oder von Gα-Transducin, die beide freie Gβγ-Untereinheiten binden, die Internalisierung des M₂ mAChRs drastisch reduziert wird, ähnlich wie und fast noch stärker als nach Expression von GRK2 K220W. Folglich kann angenommen werden, daß als Folge der Agonist-Aktivierung des M₂ mAChRs und wahrscheinlich auch des M₄ mAChRs freie Gβγ-Untereinheiten entstehen, an die die GRK2 bindet, so daß sie anschließend die Rezeptoren phosphoryliert, was schließlich die Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren induziert. Ob an diesem Prozeß der Rezeptor-Phosphorylierung durch die GRK2 weitere Regulatoren, wie die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2, Proteinkinase C und c-Src beteiligt sind, die einerseits durch diese Rezeptoren aktiviert werden und andererseits die Aktivität der GRK2 positiv oder negativ modulieren können (Winitz *et al.*, 1993; Pitcher *et al.*, 1999; Elorza *et al.*, 2000; 2003; van Koppen und Kaiser, 2003), bleibt zu untersuchen.

Wie in der Einleitung erwähnt, internalisiert der M₂ mAChR im Unterschied zu den anderen mAChR-Subtypen in HEK293-Zellen in einer β-Arrestin- und Clathrin-unabhängigen Weise (Vögler *et al.*, 1998; Claing *et al.*, 2000; Roseberry und Hosey, 2001). Des weiteren wurde für den M₂ mAChR gezeigt, daß β-Arrestin *in vitro* nicht an die dritte zytoplasmatische Schleife des Rezeptors bindet (Wu *et al.*, 1997). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß ein bisher noch nicht identifiziertes Protein an den phosphorylierten M₂ mAChR bindet und so zur Desensibilisierung und zur Clathrin-unabhängigen Internalisierung des Rezeptors führt.

Als nächstes wurde die Rolle der GRK2 und CK1α bei der Internalisierung und Desensibilisierung der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRen untersucht. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Tsuga *et al.* (1998) in COS7-Zellen konnte sowohl durch die Überexpression von Wildtyp GRK2 als auch durch Expression der GRK2 K220W-Mutante in HEK293 tsA201-Zellen eine Steigerung der Internalisierungsgeschwindigkeit des M₁ mAChRs beobachtet werden. Dieses wurde auch gefunden, wenn die Bindung von GRK2 an die Gβγ-Untereinheiten blockiert wurde (Daten wurden nicht gezeigt). In anderen Studien

wurde dagegen gezeigt, daß gereinigte GRK2 in der Lage ist, den M₁ und M₃ mAChR zu phosphorylieren und daß die GRK2 an der Internalisierung des M₁ mAChRs beteiligt ist (Lameh *et al.*, 1992; Moro *et al.* 1993; Haga *et al.*, 1996). Die hier vorgelegten Daten sprechen dagegen dafür, daß die GRK2 die Internalisierung des M₁ mAChRs Phosphorylierungs-unabhängig moduliert. Dies läßt aber auch vermuten, daß die Internalisierung dieses Rezeptors möglicherweise über eine andere Rezeptorkinase reguliert wird. Diese andere Rezeptorkinase könnte die CK1 α sein, von der gezeigt wurde, daß sie in der Lage ist, den M₁ mAChR in einer Agonist-abhängigen Weise zu phosphorylieren (Waugh *et al.*, 1999). In der Tat wurde die Internalisierungsgeschwindigkeit des M₁ mAChRs durch Expression der Kinase-defizienten CK1 α K46R-Mutante deutlich gehemmt. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß unter physiologischen Bedingungen die Internalisierung des M₁ mAChRs wahrscheinlich durch Phosphorylierung durch die CK1 α initiiert wird.

Im Gegensatz dazu spielen sowohl GRK2 als auch CK1 α bei der Internalisierung des M₃ mAChRs in HEK293-Zellen offensichtlich keine entscheidende Rolle. Die Expression von GRK2 K220W, Wildtyp CK1 α und CK1 α K46R zeigten keinen Einfluß auf die Internalisierungsgeschwindigkeit, aber das maximale Ausmaß wurde durch Expression von GRK2 K220W und Wildtyp CK1 α herabgesetzt. Ähnliche Befunde wurden für die Rolle der GRK6 bei der Internalisierung des M₃ mAChRs in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen erhoben (Willems *et al.*, 2002). Dagegen wurden sowohl die Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der Internalisierung des M₃ mAChRs durch Überexpression von Wildtyp GRK2 gesteigert. Ähnliche Befunde wurde auch in COS7- und BHK21-Zellen erhoben (Tsuga *et al.*, 1998). Wahrscheinlich wirkt sich der Grad der GRK2-vermittelten Phosphorylierung des M₃ mAChRs stimulierend auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Internalisierung aus.

Ähnlich wie andere Untersucher (Budd *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000) konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die CK1 α den M₃ mAChR in einer Agonist-abhängigen Weise phosphoryliert. Da die CK1 α aber anscheinend nicht bei Internalisierung des M₃ mAChRs beteiligt ist, wurde geprüft, ob die Phosphorylierung des Rezeptors durch die CK1 α möglicherweise die akute Signaltransduktion und ihre Desensibilisierung moduliert. Hierzu wurden die Stimulation der Phospholipase C (PLC) und die damit verbundene Ca²⁺-Freisetzung sowie die Aktivierung von ERK1/2 und der Phospholipase D (PLD) untersucht. Ähnlich wie von Tobin und Mitarbeitern (Budd *et al.*, 2000; 2001) für den M₃ mAChR in CHO-Zellen gezeigt, fanden auch wir keinen Einfluß der CK1 α auf die durch den M₁ und M₃ mAChR vermittelte Steigerung der PLC-Aktivität und der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Im Unterschied zu diesen Autoren, die berichteten, daß durch Expression der

CK1 α K46R-Mutante in CHO-Zellen die durch den M₃ mAChR induzierte Aktivierung von ERK1/2 gehemmt wird (Budd *et al.*, 2001), fanden wir auch keinerlei Einfluß von Wildtyp CK1 α oder CK1 α K46R auf die Aktivierung von ERK1/2 durch M₁ und M₃ mAChRen in HEK293-Zellen. Schließlich fanden wir auch keinen Hinweis dafür, daß die CK1 α oder die GRK2 an der Stimulation der PLD durch M₁ und M₃ mAChRen und ihrer bekannten schnellen Desensibilisierung (Schmidt *et al.*, 1995) beteiligt sind. Insgesamt lassen diesen Daten den Schluß zu, daß die CK1 α keinen Einfluß auf die durch den M₁ oder M₃ mAChR induzierte akute Signaltransduktion und ihre Desensibilisierung in HEK293-Zellen ausübt.

Zusammengefaßt zeigen die erhobenen Daten, daß die GRK2, aber nicht die CK1 α , eine wichtige Rolle bei der Desensibilisierung und Internalisierung der G_i-gekoppelten M₂ und M₄ mAChRen in HEK293-Zellen spielt und daß die Internalisierung des M₁ mAChRs, aber nicht des M₃ mAChRs, von der CK1 α abhängig ist, obwohl die CK1 α den M₃ mAChR in einer Agonist-abhängigen Weise phosphoryliert. Es wurden auch keinerlei Hinweise dafür gefunden, daß die CK1 α bei der akuten Signaltransduktion der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRen und ihrer Desensibilisierung eine Rolle spielt.

4.2 Rolle von Intersectin bei der Internalisierung der M₁ und M₂ mAChRen

Ausgangspunkt für die Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von Intersectin bei der Internalisierung von mAChRen waren Befunde, die zeigten, daß Isoformen von Intersectin in der Lage sind, die Clathrin-vermittelte Endozytose durch Sequestrierung von Bindungspartnern zu blockieren (Hussain *et al.*, 1999; Sengar *et al.*, 1999; Pucharcos *et al.*, 2000). Deshalb wurde geprüft, ob Intersectin bei der Internalisierung von M₁ und M₂ mAChRen beteiligt ist. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß diese beiden mAChR-Subtypen in einer Clathrin-abhängigen (M₁ mAChR) bzw. Clathrin-unabhängigen (M₂ mAChR) Weise internalisieren (van Koppen, 2001; Roseberry und Hosey, 2001). Hier wird gezeigt, daß die Expression der kurzen Isoform von Intersectin in HEK293 tsA201-Zellen dosisabhängig die Internalisierung des M₂ mAChRs hemmt, was darauf hinweist, daß Intersectin auch an der Clathrin-unabhängigen Internalisierung beteiligt ist.

Da bisher keine Ergebnisse vorlagen, ob die Aktivierung von GPCRen zu einer subzellulären Umverteilung von Intersectin führt, wurde dies mit dem M₂ mAChR untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die subzelluläre Lokalisation von Intersectin, das in der Zelle im Zytoplasma, an der Membran und an zirkulären Strukturen zu finden war, unabhängig von der

Aktivierung des M₂ mAChRs ist. Ein möglicher intrazellulärer Bindungspartner von Intersectin ist Eps15, das an der Clathrin-vermittelten Endozytose von Rezeptoren beteiligt ist, wie Untersuchungen mit einer dominant-negativen Mutante von Eps15 und Injektion von Eps15-Antikörpern zeigten (Benmerah *et al.*, 1995; Tebar *et al.*, 1996; Carbone *et al.*, 1997; Santolini *et al.*, 1999; Sengar *et al.*, 1999; McPherson *et al.*, 2001; O'Brayn *et al.*, 2001). Die eigenen Fluoreszenzuntersuchungen ermöglichen nicht auf ein spezifisches Protein zu schließen, mit dem Intersectin interagiert, aber die Vermutung liegt nahe, daß in HEK293-Zellen Intersectin ebenfalls mit Eps15 kolokalisiert vorliegt. In der Tat konnten vorläufige Untersuchungen zeigen, daß durch Expression der dominant-negativen Mutante von Eps15 die Internalisierung des M₂ mAChRs beeinträchtigt wird (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde der Einfluß jeder der fünf einzelnen SH3-Domäne von Intersectin auf die Internalisierung der M₁ und M₂ mAChRen untersucht. Zunächst wurde dabei festgestellt, daß die Expression der Intersectin SH3A- bis SH3E-Domänen zu einer Reduktion der Zellzahl und zu einer Verminderung der detektierbaren M₁ und M₂ mAChRen führt. Es wird vermutet, daß Intersectin ein Bindeglied zwischen Endozytose und Zellwachstum darstellt (Adams *et al.*, 2000; O'Bryan *et al.*, 2001). So wurde gezeigt, daß die SH3-Domänen (SH3A-SH3E) von Intersectin mit dem Ras-Guanininnukleotid-Austauschfaktor mSOS1 interagieren (Tong *et al.*, 2000a, 2000b). Des weiteren wurde gezeigt, daß die Expression der isolierten SH3-Domänen (SH3A-SH3E) von Intersectin die Aktivierung von Ras und die nachfolgende Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen in HEK293- und in COS7-Zellen hemmt (Tong *et al.*, 2000a). Somit ist es denkbar, daß die Expression der SH3-Domänen von Intersectin über einen ähnlichen Mechanismen die Zellzahl reduzierte.

Hinsichtlich der Internalisierung der M₁ und M₂ mAChRen ergaben die Untersuchungen mit den isolierten SH3-Domänen, daß die Internalisierung des M₂ mAChRs durch Expression von Intersectin SH3D und SH3E gehemmt wurde, während die Expression von Intersectin SH3A, SH3D und SH3E die Internalisierung des M₁ mAChRs beschleunigte. Eigentlich hätte man aufgrund der Tatsache, daß die Internalisierung von M₁ mAChRen über *clathrin-coated vesicles* (CCV) verläuft, eine Hemmung der Internalisierung erwartet, wie Untersuchungen mit der SH3A-Domäne an der CCV-vermittelten Endozytose des Transferin-Rezeptors zeigten (Simpson *et al.*, 1999). Möglicherweise wird durch die Expression von Intersectin SH3A, SH3D und SH3E ein endogener, negativer Regulator inaktiviert, was zur Folge hat, daß die Internalisierung des M₁ mAChRs gesteigert wird.

Jede der einzelnen Intersectin SH3-Domänen bindet *in vitro* mit unterschiedlicher Affinität an Dynamin (Yamabhai *et al.*, 1998). So binden die Intersectin SH3A-, SH3C- und SH3E-Domänen mit hoher Affinität an Dynamin, deutlich stärker als die SH3B-Domäne,

während die SH3D-Domäne nicht an Dynamin bindet. Hier wird gezeigt, daß die hemmende Wirkung der Intersectin SH3E-Domäne, aber nicht die der SH3D-Domäne, auf die Internalisierung des M₂ mAChRs durch die Koexpression von Wildtyp Dynamin vollständig aufgehoben werden kann. Hieraus kann geschlossen werden, daß die inhibitorische Wirkung der SH3E-Domäne durch die Interaktion mit Dynamin vermittelt wird und daß die SH3D-Domäne über eine bisher noch nicht identifizierte Interaktion die Hemmung der Internalisierung des M₂ mAChRs bewirkt. Des weiteren bestätigen diese Ergebnisse, daß die Internalisierung der mAChR-Subtypen M₁ und M₂ durch Dynamin differenziert reguliert wird, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht bekannt ist.

4.3 Rolle von Endophilin bei der Internalisierung von mAChRen

Kürzlich wurde berichtet, daß Endophilin an der Internalisierung von zwei GPCRen, nämlich des β_1 -Adrenozeptors und des Angiotensin AT_{1A}-Rezeptors beteiligt ist (Tang *et al.*, 1999; Szaszák *et al.*, 2002). Es wurde deshalb untersucht, ob und in welcher Weise Endophilin auch bei der Internalisierung von mAChRen beteiligt ist. Im Gegensatz zu Tang *et al.* (1999), die zeigten, daß die Internalisierung des G_s-gekoppelten β_1 -Adrenozeptors durch Überexpression von Endophilin in HEK293-Zellen gesteigert ist, fanden wir keinerlei Effekt nach starker Überexpression von Wildtyp Endophilin-1 in HEK293 tsA201-Zellen auf die Internalisierung von M₁ und M₂ mAChRen. Auch scheint sich die subzelluläre Lokalisation von Endophilin-1 nicht durch die Stimulation der M₁ und M₂ mAChRen zu ändern. Szaszák *et al.* (2002) berichteten andererseits, daß die Internalisierung des G_q-gekoppelten Angiotensin AT_{1A}-Rezeptors in CHO-Zellen durch Expression der isolierten SH3-Domäne von Endophilin (EndoSH3) gehemmt wird und daß diese Hemmung durch EndoSH3 wahrscheinlich auf einer Sequestrierung von endogenem Dynamin beruht, das für die Internalisierung benötigt wird. Wir fanden dagegen keinerlei Effekt von EndoSH3 auf die Internalisierung der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRen. Im Gegensatz dazu wurden durch die Expression von EndoSH3 sowohl die Geschwindigkeit als auch das maximale Ausmaß der Internalisierung der G_i-gekoppelten M₂ und M₄ mAChRen deutlich gehemmt.

Es ist bekannt, daß Endophilin über seine SH3-Domäne mit Prolin/Arginin-reichen Domänen anderer Proteine interagiert. Dies wurde spezifisch für Dynamin, Synaptojanin und Amphiphysin gezeigt, Proteine, die bekanntermaßen an der Endozytose von Vesikeln beteiligt sind (de Heuvel *et al.*, 1997; Ringstad *et al.*, 1997). Weiterhin wurde gezeigt, daß Endophilin direkt an Prolin/Arginin-reiche Domänen der dritten zytoplasmatischen Schleife des β_1 -

Adrenozeptors bindet (Tang *et al.*, 1999). Um den Mechanismus, der zur Hemmung der Internalisierung der M₂ und M₄ mAChRs durch EndoSH3 führt, aufzuklären, wurden verschiedene dieser Möglichkeiten geprüft.

Eine mögliche direkte Interaktion von EndoSH3 mit den M₂ und M₄ mAChRs konnte durch Studien mit einer M₄ mAChR-Mutante ausgeschlossen werden, bei der die dritte zytoplasmatische Schleife mit Prolin/Arginin-reichen Domänen deletiert war. Expression von EndoSH3 unterdrückte die Internalisierung dieser M₄ mAChR-Mutante genauso stark wie die des Wildtyp M₄ mAChRs. Weiterhin ist bekannt, daß der M₂ mAChR keine Prolin/Arginin-reichen Motive enthält. EndoSH3 bindet an Synaptojanin und steigert dadurch die Aktivität dieser Inositol-5-Phosphatase, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) abbaut, ein Lipid, das für die normale Funktion verschiedener an der Endozytose beteiligter Proteine essentiell ist. Diese Wirkung von EndoSH3 wird für die Hemmung der Invagination und der Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran sowie für die Hemmung der Internalisierung des Transferrin-Rezeptors durch EndoSH3 verantwortlich gemacht (Gad *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2001). Es wurde deshalb geprüft, ob EndoSH3 über diesen Mechanismus die Internalisierung der M₂ und M₄ mAChRs hemmt. Es zeigte sich, daß der zelluläre Gehalt an PI(4,5)P₂ durch die Expression von Wildtyp Endophilin und EndoSH3 nicht verändert wurde. Somit ist es eher unwahrscheinlich, daß EndoSH3 über eine Reduktion des PI(4,5)P₂-Gehaltes die Internalisierung der M₂ und M₄ mAChRs hemmt. Dies schließt jedoch nicht aus, daß EndoSH3 den Gehalt an PI(4,5)P₂ lokal am entstehenden Vesikel absenkt. Dagegen fanden wir, ähnlich wie für die Hemmung der Internalisierung des Angiotensin AT_{1A}-Rezeptors in CHO-Zellen durch EndoSH3 berichtet (Szaszák *et al.*, 2002), daß durch Koexpression von Dynamin die durch EndoSH3 induzierte Hemmung der Internalisierung des M₂ mAChRs aufgehoben wurde.

Insgesamt zeigen diese Daten, daß Endophilin ein essentielles Protein für die Internalisierung der G_i-gekoppelten M₂ und M₄ mAChRs, aber nicht der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRs ist. Ob in der Tat die Kopplung der M₂ und M₄ mAChRs an G_i-Proteine für die mAChR-Subtyp-spezifische Regulation der Internalisierung durch Endophilin eine Rolle spielt, ist nicht bekannt. Ein möglicher Hinweis dafür ist die Beobachtung, daß durch Expression von Endophilin die Bindungsaffinität von Agonisten zum β_1 -Adrenozeptor, die von der Kopplung an G_s-Proteine abhängig ist, herabgesetzt wurde (Tang *et al.*, 1999). Da die Überexpression von Dynamin spezifisch die negative Wirkung von EndoSH3 und der SH3E-Domäne von Intersectin „antagonisierte“, scheint Dynamin als Integrator der Funktion verschiedener an der Rezeptor-Internalisierung beteiligter Proteine zu fungieren. Des weiteren ist zu hervorzuheben, daß Endophilin offensichtlich sowohl bei der CVV-vermittelte Interna-

lisisierung des M₄ mAChRs als auch bei der Clathrin-unabhängigen Internalisierung des M₂ mAChRs beteiligt ist.

4.4 Rolle von Ubiquitin bei der Internalisierung und Down-Regulation des M₂ mAChRs

Untersuchungen an verschiedenen GPCRen hatten gezeigt, daß das Ubiquitin-Proteasom-System bei der Internalisierung und/oder beim Abbau (Down-Regulation) von Rezeptoren (Hefe Pheromonrezeptoren Ste2p und Ste3p, β_2 -Adrenozeptor, δ -Opioid-Rezeptor und Thyrotropin-Releasing Hormon-Rezeptor) beteiligt ist (Hicke und Riezman; 1996; Terrell *et al.*, 1998; Roth und Davis, 2000; Petäjä-Repo *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2003). Wie in der Einleitung dargestellt, internalisiert der M₂ mAChR in Abhängigkeit von Dynamin, aber im Unterschied zu M₁, M₃ und M₄ mAChRen in einer β -Aresstin- und Clathrin-unabhängigen Weise, und wird anschließend intrazellulär abgebaut (van Koppen, 2001). In dieser Arbeit sollte deshalb die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei der Internalisierung und Down-Regulation dieses Rezeptors untersucht werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Internalisierung des M₂ mAChRs, jedoch anscheinend nicht die der M₁ und M₄ mAChRen von Ubiquitin reguliert wird. Diese Schlußfolgerung beruht auf Untersuchungen mit der Ubiquitin K48R-Mutante, mit der Zielsubstrate zwar mono-ubiquityliert werden können, aber die Elongation zur Multi-Ubiquitinisozeptidkette blockiert ist. Andererseits gibt es in der Literatur Hinweise dafür, daß eine Mono-Ubiquitylierung ausreicht, um die Internalisierung von Rezeptoren, z.B. des EGF-Rezeptors zu induzieren (Hicke, 2001; Haglund *et al.*, 2003; Mosesson *et al.*, 2003). Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, daß die M₁ und M₄ mAChRen in einer mono-ubiquitylierten Art und Weise internalisiert werden. Für den β_2 -Adrenozeptor wurde gezeigt, daß die Internalisierung durch die Ubiquitylierung von β -Arrestin über die Ubiquitinligase MDM2 erfolgt (Shenoy *et al.*, 2001; Shenoy und Lefkowitz, 2003). Da auch M₁ und M₄ mAChRen in einer β -Arrestin-abhängigen Weise internalisieren (van Koppen, 2001), könnte ähnliches auch für die Internalisierung dieser Rezeptoren zutreffen.

Ob der M₂ mAChR oder ein nicht identifiziertes Adapter-Protein multi-ubiquityliert wird, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Ein möglicher Hinweis, daß der M₂ mAChR nicht direkt ubiquityliert wird, erbrachten Desensibilisierungs-Untersuchungen, die zeigten, daß der M₂ mAChR unabhängig von Ubiquitin desensibilisiert. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben, daß De-Ubiquitylierungs-Enzyme an der Plasmamembran zu

finden sind. Diese Enzyme sind in der Lage, diese post-translationalen Proteinmodifikationen von einzelnen bzw. mehreren Ubiquitin-Molekülen vom Zielsubstrat abzuspalten (Chung und Baek, 1999; Wilkinson, 2000). Somit wäre es vorstellbar, daß der M₂ mAChR sehr schnell ubiquitinyliert bzw. de-ubiquitinyliert wird, so daß dieses Ereignis nicht detektiert werden könnte.

Langdauernde Stimulation von mAChRen mit Agonisten führt zum Abbau (Down-Regulation) der Rezeptoren (van Koppen und Kaiser, 2003). Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob Multi-Ubiquitinylierung beim Abbau von M₂ und M₄ mAChRen beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, daß der M₂ mAChR, aber nicht der M₄ mAChR, Multi-Ubiquitinylierungs-abhängig in HEK293-Zellen abgebaut wird. In vielen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Multi-Ubiquitinylierung von Proteinen und ihrem Abbau im Proteasom und/oder in Lysosomen gezeigt werden (Hershko und Ciechanover, 1998). Demnach lag es nahe zu prüfen, sowohl den lysosomalen als auch den proteasomalen Abbau der M₂ und M₄ mAChRen zu untersuchen. Die Down-Regulation der M₂ mAChRen, aber nicht die der M₄ mAChRen, konnte durch Hemmung der Proteasomen durch Lactacystin vollständig blockiert werden. Überraschenderweise unterdrückte die Hemmung der Lysosomen durch Chloroquin oder NH₄Cl den Abbau beider mAChR-Subtypen. Unter Einbeziehung der in dieser Arbeit erzielten Daten und der anderer Autoren zur Rolle von ARF6 bei der Internalisierung des M₂ mAChRs (Roseberry und Hosey, 2001; Delaney *et al.*, 2002) wird deshalb angenommen, daß der internalisierte M₂ mAChR mittels ARF6 in Endosomen gelangt und daß die Ubiquitinylierung den Abbau des Rezeptors im Proteasom und in Lysosomen zuläßt.

4.5 Bedeutung der verschiedenen untersuchten Proteine für die Internalisierung von mAChR-Subtypen

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Rezeptorkinasen GRK2 und CK1 α sowie Intersectin, Endophilin und Ubiquitin hinsichtlich ihrer möglichen Beteiligung bei der Desensibilisierung, Internalisierung und beim Abbau der M₁ - M₄ mAChR-Subtypen in HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen untersucht. Die Ergebnisse bzgl. der Rolle der untersuchten Proteine bei der Internalisierung der mAChR-Subtypen in HEK293 tsA201-Zellen sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Insgesamt ergibt sich daraus ein differenziertes Modell zur Rolle der genannten Proteine bei der Internalisierung der verschiedenen mAChR-Subtypen.

Tab. 4.1: Rolle der untersuchten Proteine bei der Internalisierung von M₁ - M₄ mAChRen in HEK293 tsA201-Zellen.

Unsere Arbeitsgruppe charakterisierte in früheren Studien die Rolle von β -Arrestin, Clathrin und Dynamin bei der Internalisierung der mAChRen, wobei Dynamin für die Internalisierung aller vier mAChR-Subtypen essentiell ist und deshalb nicht aufgeführt ist. (n.u., nicht untersucht; ¹Vögler *et al.*, 1999; weitere Details siehe Text)

mAChR-Subtyp	Internalisierung		Internalisierung				
	β -Arrestin	Clathrin	GRK2	CK1 α	Intersectin	Endophilin	Ubiquitin
M₁ mAChR	ja ¹	ja ¹	ja	ja	ja	nein	nein
M₃ mAChR	ja ¹	ja ¹	nein	nein	n.u.	nein	n.u.
M₂ mAChR	nein ¹	nein ¹	ja	nein	ja	ja	ja
M₄ mAChR	ja ¹	ja ¹	ja	nein	n.u.	ja	nein

Wie aus der Tab. 4.1 hervorgeht, konnte in dieser Arbeit zum erstenmal gezeigt werden, daß die Internalisierung der G_q-gekoppelten M₁ und M₃ mAChRen in einer unterschiedlichen Weise durch die GRK2 und die CK1 α reguliert wird, während bei den G_i-gekoppelten M₂ und M₄ mAChRen ausschließlich die GRK2 an der Regulation der Internalisierung beteiligt ist. Andererseits ist die CK1 α bei der Internalisierung des M₁ mAChRs, aber nicht des M₃ mAChRs beteiligt. Aufgrund der Phosphorylierung des M₃ mAChRs durch die CK1 α hätte man erwartet, daß die CK1 α an der Internalisierung auch des M₃ mAChRs beteiligt ist. Weiterhin erbrachten die Untersuchungen dieser Arbeit keinerlei Hinweise darauf, daß diese Kinase bei der Signaltransduktion über die M₁ und M₃ mAChRen und ihrer Abschaltung in HEK293-Zellen beteiligt ist. Generell bleibt also festzuhalten, daß offensichtlich unterschiedliche Rezeptorkinasen die mAChR-Subtypen phosphorylieren können, daß diese Phosphorylierung aber nicht darüber entscheidet, über welchen Endozytoseweg (β -Arrestin- und Clathrin-abhängig oder -unabhängig) diese Rezeptoren internalisieren.

Wie aus der Tab. 4.1 weiter zu entnehmen ist, konnte eine Beteiligung aller untersuchten Proteine bei der Internalisierung des M₂ mAChRs festgestellt werden, wohingegen die Internalisierung des M₁ mAChRs durch Intersectin und die des M₄ mAChRs, aber nicht die der M₁ und M₃ mAChRen durch Endophilin-1 reguliert wird. Bisherige Studien zu Intersectin hatten sich nicht mit der Internalisierung von GPCRen befaßt. Zu Endophilin war bekannt, daß es die Internalisierungsgeschwindigkeit des β_1 -Adrenozeptors steigert (Tang *et al.*, 1999) und daß die isolierte SH3-Domäne von Endophilin die Internalisierung des Angio-

tensin AT_{1A}-Rezeptors hemmt (Szaszák *et al.*, 2002). Diese Wirkung der SH3-Domäne konnte, ähnlich wie hier für die Internalisierung des M₂ mAChRs gezeigt, durch Koexpression von Dynamin aufgehoben werden. Zusammengefaßt scheint Endophilin also eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von GPCRen und der Regulation von Dynamin am entstehenden Vesikel einzunehmen.

Schließlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Ubiquitin die Internalisierung und die Down-Regulation des M₂ mAChRs reguliert. Auch für andere GPCRen konnte diese Funktion der Ubiquitinylierung beobachtet werden (Petäjä-Repo *et al.*, 2001; Shenoy *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2003; Shenoy und Lefkowitz 2003). Anscheinend übernimmt Ubiquitin eine Signalfunktion für einige GPCRen, sowohl bei der Internalisierung als auch für den anschließenden intrazellulären Abbau der Rezeptoren. Die Charakterisierung der zugrundeliegenden Mechanismen werden zukünftig weitere Einblicke in die genaue Funktionsweise der untersuchten Proteine bei der Internalisierung von mAChRen geben können.

5 Zusammenfassung

Extrazelluläre Signalmoleküle, wie Hormone, Neurotransmitter und Mediatoren binden in der Regel an membranständige Rezeptoren und lösen eine Kaskade von zellulären Reaktionen aus, die zu einer spezifischen Zellantwort führen. Die größte Gruppe der membranständigen Rezeptoren sind die sog. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRn), die nach Bindung von spezifischen Agonisten nachgeschaltete heterotrimere G-Proteine aktivieren, worüber unterschiedliche Signaleffektoren, wie die Adenylylcyclase, die Phospholipase C oder Ionenkanäle aktiviert oder gehemmt werden. Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRen) mit ihren bekannten Subtypen M_1 - M_5 gehören zur GPCR-Superfamilie. Ähnlich wie andere GPCRn unterliegen auch die mAChRen selbst einer Regulation. Dies betrifft einmal die Abschwächung der Signalweiterleitung (Desensibilisierung) sowie die Internalisierung und den Abbau (Down-Regulation) der Rezeptoren. Für die beiden ersten Prozesse ist es anscheinend erforderlich, daß die Rezeptoren durch Rezeptorkinasen phosphoryliert werden, an die dann Adapter-Proteine wie β -Arrestin binden, was dann die Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren auslöst. Frühere Untersuchungen an den mAChR-Subtypen hatten ergeben, daß die M_1 , M_3 und M_4 mAChRen unter Beteiligung von β -Arrestin über sog. *clathrin-coated vesikel* (CCV) in HEK293-Zellen internalisieren und daß sie anschließend wieder an die Zelloberfläche zurückkehren. Im Gegensatz dazu internalisiert der M_2 mAChR nicht über CCV, sondern wird über andere, bisher noch nicht bekannte Vesikel in das Zellinnere transportiert und anschließend in der Zelle abgebaut. Für die Vesikel-Abschnürung bei der mAChR-Internalisierung ist Dynamin für alle vier mAChR-Subtypen essentiell. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der beiden Rezeptorkinasen Caseinkinase 1α (CK1 α) und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) sowie der Proteine Intersectin, Endophilin und Ubiquitin bei der Desensibilisierung, Internalisierung und Down-Regulation der mAChR-Subtypen M_1 - M_4 zu charakterisieren.

Die Untersuchungen, die mittels transienter oder stabiler Expression der M_1 - M_4 mAChRen und der genannten Proteine sowie von spezifischen Mutanten dieser Proteine in HEK293- und HEK293 tsA201-Zellen durchgeführt wurden, zeigten hinsichtlich der beiden Rezeptorkinasen, daß die GRK2, aber nicht die CK1 α für die Desensibilisierung und Internalisierung des M_2 mAChRs sowie für die Internalisierung des M_4 mAChRs verantwortlich ist. Dagegen kann die Internalisierung des M_1 mAChRs sowohl durch CK1 α als auch GRK2 reguliert werden, während die Internalisierung des M_3 mAChRs weder durch CK1 α noch durch GRK2 wesentlich gesteuert wird. Weitergehende Untersuchungen zur CK1 α , die die M_1 und M_3 mAChRen in einer Agonist-abhängigen Weise phosphoryliert, ergaben, daß die

CK1 α weder bei der akuten Signaltransduktion (Stimulation von Phospholipase C und D, Calcium-Freisetzung und Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen) über diese mAChR-Subtypen noch ihrer Desensibilisierung beteiligt ist.

Studien mit heterologer Expression von Wildtyp Intersectin und der fünf isolierten SH3-Domänen (SH3A - E) dieses Proteins ergaben, daß Intersectin wahrscheinlich über seine SH3E- und SH3D-Domänen die Internalisierung des M₂ mAChRs negativ reguliert. Die Wirkung der SH3E-Domäne erfolgt offensichtlich über eine Interaktion mit Dynamin, während die SH3D-Domäne mit einem bisher nicht identifizierten Protein interagiert. Interessanterweise wurde die Geschwindigkeit der Internalisierung des M₁ mAChRs durch Expression der SH3A-, SH3D- und SH3E-Domänen von Intersectin gesteigert. Hiermit konnte erstmalig eine Beteiligung von Intersectin bei der Internalisierung von GPCRs gezeigt werden.

Endophilin ist ein für die Invagination und Endozytose von synaptischen Vesikeln essentielles Protein, das über seine SH3-Domäne mit verschiedenen anderen Proteinen, wie Dynamin, Synaptojanin oder auch Rezeptoren interagiert. Untersuchungen mit Wildtyp Endophilin und seiner isolierten SH3-Domäne ergaben, daß die Internalisierung der M₂ und M₄ mAChRs, aber nicht die der M₁ und M₃ mAChRs durch Endophilin reguliert wird. Diese Regulation erfolgt wahrscheinlich über eine Interaktion von Endophilin mit Dynamin, während keine Hinweise für eine Beteiligung der Inositol-5-Phosphatase Synaptojanin oder eine direkte Interaktion von Endophilin mit mAChRs gefunden wurden.

Da im Gegensatz zu den anderen mAChR-Subtypen internalisierte M₂ mAChRs nicht mehr an die Plasmamembran zurückkehren, sondern intrazellulär abgebaut werden, wurde geprüft, ob eine Ubiquitylierungsreaktion bei der Internalisierung und Down-Regulation des M₂ mAChRs beteiligt ist. Untersuchungen mit einer Ubiquitin-Mutante, die eine Multi-Ubiquitylierung von Proteinen verhindert, ergaben, daß die Internalisierung und Down-Regulation des M₂ mAChRs, aber nicht die der M₁ und M₄ mAChRs, von einer Multi-Ubiquitylierungsreaktion abhängig sind. Weiterhin konnte die Down-Regulation des M₂ mAChRs sowohl durch spezifische proteasomale als auch durch lysosomale Hemmstoffe unterbunden werden. Auch wenn das hierbei beteiligte Ubiquitin-Target bisher nicht identifiziert wurde, so lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, daß das oben erwähnte besondere Verhalten der internalisierten M₂ mAChRs möglicherweise darauf beruht, daß die Internalisierung dieses Rezeptors von einer Multi-Ubiquitylierungsreaktion begleitet ist, die ihn zum proteasomalen und lysosomalen Abbau hinführt und damit seine Rückkehr an die Plasmamembran verhindert.

6 Referenzen

- Adams, A., Thorn, J.M., Yamabhai, M., Kay, B.K., & O'Bryan, J.P. (2000). Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 27414-27420
- Ahn, S., Maudsley, S., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., & Daaka, Y. (1999). Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for β 2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 1185-1188
- Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., & Struhl, K. (1989). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, NY
- Basile, A.S., Fedorova, I., Zapata, A., Liu, X., Shippenberg, T., Duttaroy, A., Yamada, M., & Wess, J. (2002). Deletion of the M₅ muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11452-11457
- Benmerah, A., Gagnon, J., Begue, B., Megarbane, B., Dautry-Varsat, A., & Cerf-Bensussan, N. (1995). The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J. Cell Biol.* **131**, 1831-1838
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
- Binns, D.D., Helms, M.K., Barylko, B., Davis, C.T., Jameson, D.M., Albanesi, J.P., & Eccleston, J.F. (2000). The mechanism of GTP hydrolysis by dynamin II: a transient kinetic study. *Biochemistry* **39**, 7188-7196
- Bohley, P., & Seglen, P.O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* **48**, 151-157
- Bonifacino, J.S., & Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 19-57
- Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C., & Brann, M.R. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**, 527-532
- Bonner, T.I., Young, A.C., Brann, M.R., & Buckley, N.J. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403-410
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Budd, D.C., McDonald, J.E., & Tobin, A.B. (2000). Phosphorylation and regulation of a G_{q/11}-coupled receptor by casein kinase 1 α . *J. Biol. Chem.* **275**, 19667-19675
- Budd, D.C., Willars, G.B., McDonald, J.E., & Tobin, A.B. (2001). Phosphorylation of the G_{q/11}-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 4581-4587
- Bünemann, M., & Hosey, M.M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol.* **517**, 5-23
- Carbone, R., Fre, S., Iannolo, G., Belleudi, F., Mancini, P., Pelicci, P.G., Torrisi, M.R., & Di Fiore, P.P. (1997). Eps15 and Eps15R are essential components of the endocytic pathway. *Cancer Res.* **57**, 5498-5504
- Caulfield, M.P. (1993). Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* **58**, 319-379.
- Ceresa, B.P., & Schmid, S.L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 204-210
- Challiss, R.A.J., Batty, I.H., & Nahorski, S.R. (1988). Mass measurements of inositol-(1,4,5)trisphosphate in rat cerebral cortex slices using a radioreceptor assay: effects of neurotransmitters and depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 684-691
- Chilvers, E.R., Batty, I.H., Challiss, R.A.J., Barnes, P.J., & Nahorski, S.R. (1991). Determination of mass changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and evidence for agonist-stimulated metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in airway smooth muscle. *Biochem. J.* **275**, 373-379

- Chung, C.H., & Baek, S.H. (1999). Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 633-640
- Claing, A., Perry, S.J., Achiriloaie, M., Walker, J.K., Albanesi, J.P., Lefkowitz, R.J., & Premont, R.T. (2000). Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1119-1124
- Conner, S.D., & Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37-44
- Cook, L.B., Zhu, C.C., & Hinkle, P.M. (2003). TRH receptor processing: Role of ubiquitination and proteasomal degradation. *Mol. Endocrinol.* 2003 Jun 12
- Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847
- Craft, C.M., & Whitmore, D.H. (1995). The arrestin superfamily: cone arrestins are a fourth family. *FEBS Lett.* **362**, 247-255
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C.F., Fenteany, G., Goldberg, A.L., & Rock, K.L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin β -lactone modify multiple proteasome β -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **272**, 13437-13445
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., & Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915-934
- de Heuvel, E., Bell, A.W., Ramjaun, A.R., Wong, K., Sossin, W.S., & McPherson, P.S. (1997). Identification of the major synaptotagmin-binding proteins in brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 8710-8716
- DeBurman, S.K., Kunapuli, P., Benovic, J.L., & Hosey, M.M. (1995). Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol. Pharmacol.* **47**, 224-233
- Delaney, K.A., Murph, M.M., Brown, L.M., & Radhakrishna H (2002). Transfer of M₂ muscarinic acetylcholine receptors to clathrin-derived early endosomes following clathrin-independent endocytosis. *J. Biol. Chem.* 2002 **277**, 33439-33446
- Dicker, F., Quitterer, U., Winstel, R., Honold, K., & Lohse, M.J. (1999). Phosphorylation-independent inhibition of parathyroid hormone receptor signaling by G protein-coupled receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5476-5481
- Eglen, R.M., & Nahorski, S.R. (2000). The muscarinic M₅ receptor: a silent or emerging subtype? *Br. J. Pharmacol.* **130**, 13-21
- Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S., & Mayor, F. Jr. (2003). MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **278**, 29164-29173
- Elorza, A., Sarnago, S., & Mayor, F. Jr. (2000). Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* **57**, 778-783
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S.R., Rose, K., & De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* **155**, 193-200
- Ferguson, S.S.G. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**, 1-24
- Gad, H., Ringstad, N., Low, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M.H., De Camilli, P., Shupliakov, O., & Brodin, L. (2000). Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301-312
- Galcheva-Gargova, Z., Theroux, S.J., & Davis, R.J. (1995). The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin. *Oncogene* **11**, 2649-2655
- Gerber, D.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Huang, S.Y., Caron, M.G., & Tonegawa, S. (2001). Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M₁ muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15312-15317

- Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Bella Valle, G., & Migone, N. (1997). A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* **41**, 427-434
- Gomez, J., Shannon, H., Kostenis, E., Felder, C., Zhang, L., Brodtkin, J., Grinberg, A., Sheng, H., & Wess, J. (1999a). Pronounced pharmacologic deficits in M₂ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1692-1697
- Gomez, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C., Bymaster, F., Brodtkin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C., & Wess, J. (1999b). Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10483-10488
- Goodman, O.B. Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., & Benovic, J.L. (1996). β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450
- Haga, K., Kameyama, K., & Haga, T. (1994). Synergistic activation of a G protein-coupled receptor kinase by G protein $\beta\gamma$ -subunits and mastoparan or related peptides. *J. Biol. Chem.* **269**, 12594-12599
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K., & Uchiyama, H. (1996). Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 2776-2782
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P., & Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 461-466
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
- Hamilton, S.E., & Nathanson, N.M. (2001). The M₁ receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 15850-15853
- Hamilton, S.E., Loose, M.D., Qi, M., Levey, A.I., Hille, B., McKnight, G.S., Idzerda, R.L., & Nathanson, N.M. (1997). Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13311-13316
- Hamm, H.E. (2001). How activated receptors couple to G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4819-4821
- Hamm, H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669-672
- Hamm, H.E., & Gilchrist, A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 189-196
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-5580
- Heneweer, C., Kruse, L.H., Kindhäuser, F., Schmidt, M., Jakobs, K.H., Denker, H.W., Thie, M. (2002). Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: Rho protein regulation. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 1014-1022
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479
- Hicke, L. & Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84**, 277-287
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195-201
- Hill, E., van der Kaay, J., Downes, C.P., & Smythe, E. (2001). The role of dynamin and its binding partners in coated pit invagination and scission. *J. Cell Biol.* **152**, 309-323
- Hinshaw, J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 483-519
- Hirsch, C., & Ploegh, H.L. (2000). Intracellular targeting of the proteasome. *Trends Cell Biol.* **10**, 268-272
- Hollinger, S., & Hepler, J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* **54**, 527-525

- Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A., & Blobel, C.P. (1999). Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* **274**, 31693-31699
- Hussain, N.K., Yamabhai, M., Ramjaun, A.R., Guy, A.M., Baranes, D., O'Bryan, J.P., Der, C.J., Kay, B.K., & McPherson, P.S. (1999). Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 15671-15677
- Huttner, W.B., & Schmidt, A. (2000). Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission-insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 543-551
- Iacovelli, L., Sallese, M., Mariggio, S., & de Blasi, A. (1999). Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J.* **13**, 1-8
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., & Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 893-905
- Kim, Y.M., & Benovic, J.L. (2002). Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **277**, 30760-30768
- Koch, W.J., Inglese, J., Stone, W.C., & Lefkowitz, R.J. (1993). The binding site for the $\beta\gamma$ -subunits of heterotrimeric G proteins on the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 8256-8260
- Koch, W.J., Rockman, H.A., Samama, P., Hamilton, R.A., Bond, R.A., Milano, C.A., & Lefkowitz, R.J. (1995). Cardiac function in mice overexpressing the β -adrenergic receptor kinase or a β ARK inhibitor. *Science* **268**, 1350-1353
- Kohout, T.A., & Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* **63**, 9-18
- Kornitzer, D., & Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell Physiol.* **182**, 1-11
- Krudewig, R., Langer, B., Vögler, O., Marksches, N., Erl, M., Jakobs, K.H., & van Koppen, C.J. (2000). Distinct internalization of M_2 muscarinic acetylcholine receptors confers selective and long-lasting desensitization of signaling to phospholipase C. *J. Neurochem.* **74**, 1721-1730
- Krupnick, J.G., & Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 289-319
- Kunapuli, P., Onorato, J.J., Hosey, M.M., & Benovic, J.L. (1994). Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J. Biol. Chem.* **269**, 1099-1105
- Lameh, J., Philip, M., Sharma, Y.K., Moro, O., Ramachandran, J., & Sadée, W. (1992). Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop. *J. Biol. Chem.* **267**, 13406-13412
- Laporte, S.A., Miller, W.E., Kim, K.M., & Caron, M.G. (2002). β -Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a β -arrestin binding site in β 2-adaptin. *J. Biol. Chem.* **277**, 9247-9254
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., & Caron, M.G. (2000). The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **275**, 23120-23126
- Laub, M., Steppuhn, J.A., Blügel, M., Immler, D., Meyer, H.E., & Jennissen, H.P. (1998). Modulation of calmodulin function by ubiquitin-calmodulin ligase and identification of the responsible ubiquitylation site in vertebrate calmodulin. *Eur. J. Biochem.* **255**, 422-431
- Levey, A.I. (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* **52**, 441-448
- Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., & Brann, M.R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* **11**, 3218-3226

- Liu, J.P., Yajima, Y., Li, H., Ackland, S., Akita, Y., Stewart, J., & Kawashima, S. (1997). Molecular interactions between dynamin and G-protein $\beta\gamma$ -subunits in neuroendocrine cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **132**, 61-71
- Longva, K.E., Blystad, F.D., Stang, E., Larsen, A.M., Johannessen, L.E., & Madhus, I.C. (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* **156**, 843-854
- Luttrell, L.M., Daaka, Y., & Lefkowitz, R.J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 177-183
- Marchese, A., & Benovic, J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J. Biol. Chem.* **276**, 45509-45512
- Matsui, M., Motomura, D., Karasawa, H., Fujikawa, T., Jiang, J., Komiya, Y., Takahashi, S., & Taketo, M.M. (2000). Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M_3 subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9579-9584
- McPherson, P.S., Kay, B.K., & Hussain, N.K. (2001). Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* **2**, 375-384.
- Micheva KD, Kay BK, & McPherson PS (1997). Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *J. Biol. Chem.* **272**, 27239-27245
- Miyakawa, T., Yamada, M., Duttaroy, A., & Wess, J. (2001). Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M_1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Neurosci.* **14**, 5239-5250
- Mori, S., Claesson-Welsh, L., Okuyama, Y., & Saito, Y. (1995). Ligand-induced polyubiquitination of receptor tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 32-39
- Mori, S., Heldin, C.H., & Claesson-Welsh, L. (1992). Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor β -receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 6429-6434
- Moro, O., Lameh, J., & Sadée, W. (1993). Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 6862-6865
- Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., & Yarden, Y. (2003). Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 21323-21326
- Muratani, M., & Tansey, W.P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 192-201
- Nathanson, N.M. (1987). Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev. Neurosci.* **10**, 195-236
- Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257
- O'Bryan, J.P., Mohnney, R.P., & Oldham, C.E. (2001). Mitogenesis and endocytosis: What's at the intersection? *Oncogene* **20**, 6300-6308
- Palmer, S., Hughes, K.T., Lee, D.Y., & Wakelam, M.J. (1989). Development of a novel, Ins(1,4,5)P₃-specific binding assay. Its use to determine the intracellular concentration of Ins(1,4,5)P₃ in unstimulated and vasopressin-stimulated rat hepatocytes. *Cell Signal.* **1**, 147-156
- Pals-Rylaarsdam, R., & Hosey, M.M. (1997). Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 14152-14158
- Pals-Rylaarsdam, R., Xu, Y., Witt-Enderby, P., Benovic, J.L., & Hosey, M.M. (1995). Desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor are directed by independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 29004-29011
- Peralta, E.G., Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Smith, D.H., Ramachandran, J., & Capon, D.J. (1987). Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* **6**, 3923-3929
- Petäjä-Repo, U.E., Hogue, M., Laperrière, A., Bhalla, S., Walker, P., & Bouvier, M. (2001). Newly synthesized human δ opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **276**, 4416-4423

- Petrelli, A., Gilestro, G.F., Lanzardo, S., Comoglio, P.M., Migone, N., & Giordano, S. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-190
- Pierce, K.L., Maudsley, S., Daaka, Y., Luttrell, L.M., & Lefkowitz, R.J. (2000). Role of endocytosis in the activation of the extra-cellular signal-regulated kinase cascade by sequestering and nonsequestering G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1489-1494
- Pippig, S., Andexinger, S., & Lohse, M.J. (1995). Sequestration and recycling of β 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**, 666-676
- Pitcher, J.A., Freedman, N.J., & Lefkowitz, R.J. (1998). G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 653-692
- Pitcher, J.A., Tesmer, J.J., Freeman, J.L., Capel, W.D., Stone, W.C., & Lefkowitz, R.J. (1999). Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 34531-34534
- Pitcher, J.A., Touhara, K., Payne, E.S., & Lefkowitz, R.J. (1995). Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G $\beta\gamma$ subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707-11710
- Premont, R.T., Koch, W.J., Inglese, J., & Lefkowitz, R.J. (1994). Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 6832-6841
- Premont, R.T., Macrae, A.D., Stoffel, R.H., Chung, N., Pitcher, J.A., Ambrose, C., Inglese, J., MacDonald, M.E., & Lefkowitz, R.J. (1996). Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J. Biol. Chem.* **271**, 6403-6410
- Pucharcos, C., Estivill, X., & de la Luna, S. (2000). Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* **478**, 43-51
- Ramjaun, A.R., Angers, A., Legendre-Guillemin, V., Tong, X.K., & McPherson, P.S. (2001). Endophilin regulates JNK activation through its interaction with the germinal center kinase-like kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 28913-28919
- Reutens, A.T., & Begley, C.G. (2002). Endophilin-1: a multifunctional protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1173-1177
- Rhee, S.G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281-312
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., & De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143-154
- Ringstad, N., Nemoto, Y., & De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8569-8574
- Ringstad, N., Nemoto, Y., & De Camilli, P. (2001). Differential expression of endophilin 1 and 2 dimers at central nervous system synapses. *J. Biol. Chem.* **276**, 40424-40430
- Roos, J., & Kelly, R.B. (1998). Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain-containing protein that interacts with *Drosophila* dynamin. *J. Biol. Chem.* **273**, 19108-19119
- Roseberry, A.G., & Hosey, M.M. (2001). Internalization of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. *J. Cell Sci.* **114**, 739-746
- Roth, A.F., & Davis, N.G. (2000). Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 8143-8153
- Rümenapp, U., Asmus, M., Schabrowski, H., Woznicki, M., Han, L., Jakobs, K.H., Fahimi-Vahid, M., Michalek, C., Wieland, T., & Schmidt, M. (2001). The M₃ muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G₁₂ but not G_q-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J. Biol. Chem.* **276**, 2474-2479

- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., Waterfield, M.D., & Panayotou, G. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241-6250
- Sambook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Santolini, E., Salcini, A.E., Kay, B.K., Yamabhai, M., & Di Fiore, P.P. (1999). The EH network. *Exp. Cell Res.* **253**, 186-209
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B., & Soling, H.D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-141
- Schmidt, M., Fasselt, B., R menapp, U., Bienek, C., Wieland, T., van Koppen, C.J., & Jakobs, K.H. (1995). Rapid and persistent desensitization of m3 muscarinic acetylcholine receptor-stimulated phospholipase D. Concomitant sensitization of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **270**, 19949-19956
- Sengar, A.S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S., & Egan, S.E. (1999). The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J.* **18**, 1159-1171
- Shenoy, S.K., & Lefkowitz, R.J. (2003). Trafficking patterns of β -arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β -arrestin deubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 14498-14506
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., & Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin. *Science* **294**, 1307-1313
- Siderovski, D.P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T.W., & Tyers, M. (1996). A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr. Biol.* **6**, 211-222
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808
- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S., & Schmid, S.L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* **1**, 119-124
- Song, B.D., & Schmid, S.L. (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* **42**, 1369-1376
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W.Y., & Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-187
- Sparks, A.B., Hoffman, N.G., McConnell, S.J., Fowlkes, D.M., & Kay, B.K. (1996). Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins. *Nat. Biotechnol.* **14**, 741-744
- Stengel, P.W., Gomeza, J., Wess, J., & Cohen, M.L. (2000). M₂ and M₄ receptor knockout mice: muscarinic receptor function in cardiac and smooth muscle in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 877-885
- Stoffel, R.H., Inglese, J., Macrae, A.D., Lefkowitz, R.J., & Premont, R.T. (1998). Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6. *Biochemistry* **37**, 16053-16059
- Stoffel, R.H., Randall, R.R., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., & Inglese, J. (1994). Palmitoylation of G protein-coupled receptor kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family. *J. Biol. Chem.* **269**, 27791-27794
- Strous, G.J., & Govers, R. (1999). The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J. Cell Sci.* **112**, 1417-1423
- Strous, G.J., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A., & Schwartz, A.L. (1996). The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO J.* **15**, 3806-3812
- Szaszák, M., G borik, Z., Turu, G., McPherson, P.S., Clark, A.J., Catt, K.J., & Hunyady, L. (2002). Role of the proline-rich domain of dynamin-2 and its interactions with Src homology 3 domains during endocytosis of the AT₁ angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 21650-21656

- Tang, Y., Hu, L.A., Miller, W.E., Ringstad, N., Hall, R.A., Pitcher, J.A., DeCamilli, P., & Lefkowitz, R.J. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the β 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12559-12564
- Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M., & Kirchhausen, T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J. Biol. Chem.* **271**, 28727-28730
- Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., & Hicke, L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* **1**, 193-202
- Tobin, A.B. (2002). Are we β -ARKing up the wrong tree? Casein kinase 1 α provides an additional pathway for GPCR phosphorylation. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 337-343
- Tobin, A.B., Keys, B., & Nahorski, S.R. (1993). Phosphorylation of a phosphoinositidase C-linked muscarinic receptor by a novel kinase distinct from β -adrenergic receptor kinase. *FEBS Lett.* **335**, 353-357
- Tobin, A.B., Keys, B., & Nahorski, S.R. (1996). Identification of a novel receptor kinase that phosphorylates a phospholipase C-linked muscarinic receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 3907-3916
- Tobin, A.B., Totty, N.F., Sterlin, A.E., & Nahorski, S.R. (1997). Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1 α . *J. Biol. Chem.* **272**, 20844-20849
- Tong, X.K., Hussain, N.K., Adams, A.G., O'Bryan, J.P., & McPherson, P.S. (2000a). Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 29894-29899
- Tong, X.K., Hussain, N.K., de Heuvel, E., Kurakin, A., Abi-Jaoude, E., Quinn, C.C., Olson, M.F., Marais, R., Baranes, D., Kay, B.K., & McPherson, P.S. (2000b). The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *EMBO J.* **19**, 1263-1271
- Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H., & Nagao, T. (1994). Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2. *J. Biol. Chem.* **269**, 32522-32527
- Tsuga, H., Okuno, E., Kameyama, K., & Haga, T. (1998). Sequestration of human muscarinic acetylcholine receptor hm1-hm5 subtypes: effect of G protein-coupled receptor kinases GRK2, GRK4, GRK5 and GRK6. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 1218-1226
- van Kerkhof, P., Govers, R., Alves dos Santos, C.M., & Strous, G.J. (2000). Endocytosis and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependent. *J. Biol. Chem.* **275**, 1575-1580
- van Koppen, C.J. (2001). Multiple pathways for the dynamin-regulated internalization of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 505-508
- van Koppen, C.J., & Kaiser, B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.* **98**, 197-220
- van Koppen, C.J., Sell, A., Lenz, W., & Jakobs, K.H. (1994). Deletion analysis of the m4 muscarinic acetylcholine receptor. Molecular determinants for activation of but not coupling to the G_i guanine-nucleotide-binding regulatory protein regulate receptor internalization. *Eur. J. Biochem.* **222**, 525-531
- Voges, D., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 1015-1068
- Vögler, O., Bogatkewitsch, G.S., Wriske, C., Krummnerl, P., Jakobs, K.H., & van Koppen, C.J. (1998). Receptor subtype-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration by dynamin. Distinct sequestration of m2 receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 12155-12160
- Vögler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K.H., & van Koppen, C.J. (1999). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by β -arrestin. *J. Biol. Chem.* **274**, 12333-12338
- von Zastrow, M., & Kobilka, B.K. (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human β 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 3530-3538
- Waugh, M.G., Challiss, R.A.J., Bernstein, G., Nahorski, S.R., & Tobin, A.B. (1999). Agonist-induced desensitization and phosphorylation of m1-muscarinic receptors. *Biochem. J.* **338**, 175-183

- Weiss, E.R., Raman, D., Shirakawa, S., Ducceschi, M.H., Bertram, P.T., Wong, F., Kraft, T.W., & Osawa, S. (1998). The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol. Vis.* **4**, 27
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169-178
- Werbonat, Y., Kleutges, N., Jakobs, K.H., & van Koppen, C.J. (2000). Essential role of dynamin in internalization of M₂ muscarinic acetylcholine and angiotensin AT_{1A} receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 21969-21974
- Wilkinson, K.D. (1995). Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 161-189
- Wilkinson, K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination, targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 141-148
- Willets, J.M., Challiss, R.A.J., & Nahorski, S.R. (2002). Endogenous G protein-coupled receptor kinase 6 Regulates M₃ muscarinic acetylcholine receptor phosphorylation and desensitization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 15523-15529
- Winitz, S., Russell, M., Qian, N.X., Gardner, A., Dwyer, L., & Johnson, G.L. (1993). Involvement of Ras and Raf in the Gi-coupled acetylcholine muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase and MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19196-19199
- Wu, G., Bogatkevich, G.S., Mukhin, Y.V., Benovic, J.L., Hildebrandt, J.D., & Lanier, S.M. (2000). Identification of Gβγ binding sites in the third intracellular loop of the M₃-muscarinic receptor and their role in receptor regulation. *J. Biol. Chem.* **275**, 9026-90234
- Wu, G., Krupnick, J.G., Benovic, J.L., & Lanier, S.M. (1997). Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and α₂-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 17836-17842
- Wylie, P.G., Challiss, R.A.J., & Blank, J.L. (1999). Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. J.* **338**, 619-628
- Yamabhai, M., Hoffman, N.G., Hardison, N.L., McPherson, P.S., Castagnoli, L., Cesareni, G., & Kay, B.K. (1998). Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 31401-31407
- Yamada, M., Miyakawa, T., Duttaroy, A., Yamanaoka, A., Moriguchi, T., Makita, R., Ogawa, M., Chou, C.J., Xia, B., Crawley, J.N., Felder, C.C., Deng, C.X., & Wess, J. (2001). Mice lacking the M₃ muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* **410**, 207-212
- Yu, S.S., Lefkowitz, R.J., & Hausdorff, W.P. (1993). β-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **268**, 337-341
- Zhang, W., Yamada, M., Gomeza, J., Basile, A.S., & Wess, J. (2002). Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M₁-M₅ muscarinic receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* **22**, 6347-6352

7 Anhang

Während der Anfertigung der Promotion entstandene Publikationen:

Originalarbeiten:

Kaiser, B., & van Koppen, C.J. (2003). Measurement of function and regulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Methods in cardiovascular research*, Springer Verlag (im Druck)

van Koppen, C.J., & Kaiser, B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.* **98**, 197-220

Abstract von Vortrags- und Posterpräsentationen auf nationalen Tagungen:

Kaiser, B., van Koppen, C.J., & Jakobs, K.H. (2003). Role of Endophilin in the internalization of muscarinic acetylcholine receptors. 44th Spring Meeting Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2003. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 184, R49

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. K. H. Jakobs für die Überlassung des Themas, die zahlreichen wertvollen Anregungen während meiner Zeit im Institut für Pharmakologie, sowie für die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. C. J. van Koppen für die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

Abschließend danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und bei all denen, die auf unterschiedlichste Weise einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Frau PD Dr. M. Schmidt, Frau Dr. D. Meier zu Heringdorf, Herrn Dr. P. Oude-Weernink, Frau B. Langer, Frau R. Krudewig und Frau S. Metze. Darüber hinaus für die zahlreichen fachlichen und persönlichen Gespräche, die ich mit allen Mitarbeitern führen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie bedanken, für das Verständnis, die Geduld und die Hilfsbereitschaft. Zu besonderen Dank bin ich Ellen Krause und meiner Tochter Nelia verpflichtet, die mich immer wieder aufs neue ermuntern haben und die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Björn Peter Kaiser
Geburtsdatum: 30. März 1971
Geburtsort: Dortmund
Familienstand: ledig, 1 Kind

SCHULAUSBILDUNG

1977 - 1981	Holte-Grundschule	Dortmund
1981 - 1984	Johannes-Kepler-Realschule	Dortmund
1985 - 1987	Städt. Hauptschule	Dortmund
1987 - 1990	Bert-Bercht-Gymnasium	Dortmund

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

BERUFSAUSBILDUNG

1991 - 1993	Chemie- und Pharmazieschule	Hannover
-------------	-----------------------------	----------

Abschluß: staatlich geprüfter CTA

HOCHSCHULAUSBILDUNG

10/1993 - 09/1999	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
09/1999	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Dr. W. Klipp Thema: „Analyse der Urease-Genregion aus dem phototrophen Purpurbakterium <i>Rhodobacter capsulatus</i> “

Abschluß: Diplom-Biologe

10/1999 - 12/2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum bei Herrn Prof. Dr. W. Klipp
-------------------	--

seit 01/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie der Universität GH Duisburg-Essen bei Herrn Prof. Dr. K. H. Jakobs
--------------	---

Oktober 2003	Anfertigung der Dissertation zur Promotion zum "Dr. rer. nat." mit dem Titel: "Regulation der Internalisierung, Desensibilisierung und Down-Regulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren durch Rezeptorkinasen, Intersectin, Endophilin und Ubiquitin"
--------------	---

Essen, den 27. Oktober 2003	Björn Peter Kaiser
-----------------------------	--------------------

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Regulation der Internalisierung, Desensibilisierung und Down-Regulation von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren durch Rezeptorkinasen, Intersectin, Endophilin und Ubiquitin" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Björn Kaiser befürworte.

Essen, 27. Oktober 2003

(Prof. Dr. K. H. Jakobs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 27. Oktober 2003

(Björn Kaiser)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 27. Oktober 2003

(Björn Kaiser)